

**Onkologische Bildgebung mittels hyperpolarisierter
 ^{13}C -Magnetresonanztomographie in einem
Ratten-HCC-Modell**

von Elisabeth Walburga Franziska Stefanie Bliemsrieder

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**Onkologische Bildgebung mittels hyperpolarisierter
 ^{13}C -Magnetresonanzspektroskopie in einem
Ratten-HCC-Modell**

von Elisabeth Walburga Franziska Stefanie Bliemsrieder

aus Tegernsee

München 2019

**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Angefertigt am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie und am
Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der
Technischen Universität München**

Mentoren: PD Dr. med. vet. habil. Christine Baumgartner
PD Dr. med. Rickmer Braren

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIV
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	5
1. Hepatozelluläres Karzinom des Menschen	5
1.1. Ätiologie und Pathogenese	5
1.2. Überwachung von Risikopatienten	7
1.3. Diagnostik.....	7
1.3.1. Bildgebungsverfahren.....	8
1.3.2. Histopathologische Diagnostik.....	9
1.3.3. Diagnosealgorithmus in Deutschland.....	10
1.4. Biomarker in der Bildgebung	11
1.5. Therapieoptionen	14
1.6. Patientenüberwachung nach der Therapie.....	15
2. Tumormetabolismus	16
2.1. Besonderheiten des Tumormetabolismus.....	16
2.2. Die Bedeutung von Laktat im Tumor	19
3. Tiermodelle des hepatozellulären Karzinoms.....	21
4. Hyperpolarisations-MRS	24
4.1. Hyperpolarisation.....	25
4.2. MRS/MRSI mit hyperpolarisiertem [1- ¹³ C]Pyruvat in der Tumorbildgebung ...	27
III. MATERIAL UND METHODEN.....	31
1. Versuchstiere	31
1.1. Tiermodelle.....	31
1.1.1. Diethylnitrosamin-induziertes hepatozelluläres Karzinom der Ratte.....	31
1.1.2. Subkutane Tumorgenerierung in der Ratte.....	31
1.2. Versuchstierhaltung	32
2. Zellisolierung.....	35

3. Zellkultur.....	36
3.1. Einfrieren und Auftauen der Zellen	37
3.2. Bestimmung der Verdopplungszeiten.....	38
3.3. Immunhistochemie zur Charakterisierung der Zellen als HCC-Klone	38
3.4. Auswertung der Immunhistochemie zur Charakterisierung als HCC-Klone	39
3.5. LDH-Aktivitätsbestimmung <i>in vitro</i>	39
3.6. „Seahorse“-Analyse	39
4. Bildgebung.....	40
4.1. Vorbereitung der Tiere	40
4.2. Bildgebungssequenzen	40
5. Hyperpolarisation	45
6. Auswertung der ¹³C-MRS.....	46
7. Ex-vivo-Gewebeaufarbeitung der subkutanen Tumore.....	48
7.1. Enzymaktivitätsbestimmung von LDH im Tumor	49
7.2. Histologie	49
7.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	50
7.2.2. Immunhistochemie.....	51
7.2.3. Histologische Auswertung.....	54
7.3. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	54
8. Statistische Analyse.....	55
IV. ERGEBNISSE	57
1. Charakterisierung der isolierten Zellklone.....	57
2. LDH-Aktivität ausgewählter Zellklone <i>in vitro</i>.....	58
3. „Seahorse“-Analyse.....	59
4. Manifestation der subkutanen Tumore.....	60
5. Beurteilung der Umsetzung von ¹³C-Pyruvat zu ¹³C-Laktat in den Tumoren in der MRS.....	62
6. LDH-Aktivität im Tumorgewebe <i>ex vivo</i>	65
7. Korrelation zwischen <i>k_{pt}</i>-Werten und LDH-Aktivität im Tumor	66
8. qRT-PCR-Ergebnisse der Tumore.....	67

9. Histologie der Tumore	68
V. DISKUSSION	71
1. Diskussion der Ergebnisse	71
2. Diskussion der Methodik	76
2.1. Tiermodell	76
2.2. <i>In-vitro</i> -Versuche	77
2.3. Implantation.....	78
2.4. ¹³ C-MRS	79
2.5. Modellierung der ¹³ C-MRS-Daten.....	80
2.6. Histologie	81
2.7. qRT-PCR	81
2.8. Limitationen.....	81
3. Ausblick.....	82
VI. ZUSAMMENFASSUNG	85
VII. SUMMARY	87
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	89
IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
X. TABELLENVERZEICHNIS	103
XI. DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
¹ H	¹ H-Wasserstoffisotop
¹³ C	¹³ C-Kohlenstoffisotop
¹⁵ N	¹⁵ N-Stickstoffisotop
¹⁸ F	¹⁸ F-Fluorisotop
³¹ P	³¹ P-Phosphorisotop
⁸⁹ Y	⁸⁹ Y-Yttriumisotop
°C	Grad Celsius
AASLD	engl.: American Association for the Study of the Liver Diseases
Abb.	Abbildung
ACLY	ATP-Citrat-Lyase
ADC	engl.: apparent diffusion coefficient
Akt	Serin/Threoninkinase Akt
ALT	Alanin-Aminotransferase
ASCT2	Alanin-Serin-Cystein-Transporter 2
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	engl.: area under the curve
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft e.V.
BCLC	engl.: Barcelona Clinic Liver Cancer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Carbamoylphosphat-Synthetase, Aspartat-Transcarbamoylase und Dihydroorotase

	(trifunktionelles Protein)
CD31	engl.: Cluster of Differentiation 31
cDNA	engl.: complementary DNA
CE	engl.: contrast enhanced
CK7	engl.: Cytokeratin 7
c-Myc	Transkriptionsfaktor c-Myc
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CT	Computertomographie/-tomograph
DCE	engl.: dynamic contrast enhanced
dDNP	engl.: dissolution dynamic nuclear polarization
DENA	Diethylnitrosamin
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DMEM	engl.: Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
DPBS	engl.: Dulbecco's phosphate-buffered saline
DWI	engl.: diffusion weighted imaging
E2F	Transkriptionsfaktoren der Familie E2F
EASL	engl.: European Association for the Study of the Liver
ECAR	engl.: extracellular acidification rate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch

et al.	et alii/-ae
FA	engl.: flip angle
FBS	fetales bovines Serum
FDG	Fluorodesoxyglukose
g	Gramm (bei Gewichtsangaben)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugeneinstellung)
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEM	engl.: genetically engineered mouse model
GLS1	Glutaminase 1
GLUT1	Glukosetransporter 1
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSHV	engl.: Ground Squirrel Hepatitis Virus
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	engl.: hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HepPar1	engl.: Hepatocyte Paraffin 1
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
Hz	Herz (Messgröße)
IARC	engl.: International Agency for Research on Cancer
ICC	engl.: intrahepatic cholangiocarcinoma
IHC	Immunhistochemie

K	Kelvin
KM	Kontrastmittel
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDH A	Laktatdehydrogenase Isoform A
lin. Reg.	lineare Regression
m	Meter
M	molar
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MCT4	Monocarboxylat-Transporter 4
min	Minute
Mio.	Million
MMTV	engl.: Mouse mammary tumor virus
MRS	engl.: magnetic resonance spectroscopy
MRSI	engl.: magnetic resonance spectroscopic imaging
MRT	Magnetresonanztomographie/-tomograph
mTORC2	engl.: mammalian target of rapamycin complex 2
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NAFLD	engl.: nonalcoholic fatty liver disease
NaOH _(aq)	Natronlauge
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance
p53	Protein p53
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHIP	engl.: parahydrogen induced polarization
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKM2	Pyruvatkinase M2
ppm	engl.: parts per million
PRPS2	Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase 2
qRT-PCR	engl.: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Ras	G-Protein Ras
RF	Radiofrequenz
RFU	engl.: relative fluorescence unit
RIPA	engl.: radioimmunoprecipitation assay
RNA	engl.: ribonucleic acid
ROS	engl.: reactive oxygen species
rpm	engl.: revolutions per minute
s	Sekunde
SABRE-SHEATH	engl.: signal amplification by reversible exchange in shield enables alignment transfer to heteronuclei
SEOP	engl.: spin exchange optical pumping
SF	Skalierungsfaktor
shRNA	engl.: small hairpin ribonucleic acid

SIRT	selektive intraarterielle Radiotherapie
SN2	Glutamintransporter SN2
Src	Tyrosinkinase Src
T	Tesla
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TE	engl.: echo time
TGF- α	engl.: Transforming growth factor - α
TR	engl.: repetition time
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Puffer
TU	Technische Universität
U	engl.: unit
UK	engl.: United Kingdom
US	Ultraschall
USA	engl.: United States of America
VEGF	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	engl.: World Health Organization
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Maligne Neoplasien des Leberparenchyms gehören mit rund 782 000 Toten jährlich weltweit zu den führenden Ursachen krebsbedingter Todesfälle und stehen an sechster Stelle der am häufigsten neu diagnostizierten Krebsleiden. Leberkrebs weist regionale, aber auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Inzidenz auf. Hohe Inzidenzraten finden sich vor allem in Süd- sowie Südostasien und Teilen Nord- und Westafrikas. Knapp drei Viertel der geschätzten Neudiagnosen 2018 entfallen auf den asiatischen Raum, gefolgt von 9,8 % Neudiagnosen in Europa und 7,7 % in Afrika (WHO, 2018). Sowohl Inzidenz als auch Mortalität sind bei Männern in fast allen Regionen zwei- bis dreimal so hoch wie bei Frauen (Bray *et al.*, 2018). So auch in Deutschland: hier zählt Leberkrebs zu den wenigen malignen Erkrankungen mit zunehmender Inzidenz und Mortalität (Robert Koch-Institut, 2016).

In 75 - 85 % der Fälle von primären, intrahepatischen, malignen Neoplasien handelt es sich um das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Die restlichen 15 - 25 % stellen intrahepatische Gallengangskarzinome und seltene Entitäten wie Angiosarkome dar (Bray *et al.*, 2018).

Die Prognose des HCCs wird maßgeblich vom klinischen Zustand des Patienten, insbesondere von der Leberinsuffizienz mitbestimmt und hängt nicht alleinig von der Tumorlast ab, wodurch eine Einschätzung der Prognose im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen deutlich erschwert wird (op den Winkel *et al.*, 2012). Die Früherkennung des hepatozellulären Karzinoms ist zur Verbesserung der Heilungschancen und gezielten Wahl einer Therapieform wichtig. Eine kurative Therapie durch Resektion oder Transplantation ist nur im frühen Krankheitsstadium möglich. Später stehen einzig palliative Therapien zur Verfügung. Aufgrund der genetischen Instabilität und proteomischen Heterogenität zeigt das HCC ein schlechtes Ansprechen auf den einzigen klinisch etablierten Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib (Ally *et al.*, 2017).

Die vorliegende Arbeit soll durch die *in-vivo*-Quantifizierung der metabolischen Leistung des HCCs einen Beitrag zur Identifizierung distinkter Subgruppen leisten. Sie basiert auf Ergebnissen einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, in welcher im Rattenmodell Diethylnitrosamin(DENA)-induzierte, endogene HCC-Läsionen mittels Hyperpolarisationsmagnetresonanztomographie untersucht wurden.

Hierbei konnten wir zwischen den einzelnen Läsionen Unterschiede in der Pyruvat-verstoffwechselung zu Laktat beobachten. Daraufhin stellten wir die Hypothese auf, dass diese Heterogenität durch Unterschiede in der metabolischen Aktivität von Tumorzellen bedingt wird und Einfluss auf die Therapiemöglichkeiten der verschiedenen Läsionen hat.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit die *in-vivo*-Analyse des HCC-Metabolismus von Pyruvat zu Laktat mittels ^{13}C -Hyperpolarisationsmagnetresonanzspektroskopie und die *ex-vivo*-Validierung der Ergebnisse anhand einzelner, aus der Ratte stammender HCC-Zelllinien im Rattenmodell.

Der gesamte Versuchsablauf lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen (siehe Abb. 1):

Im ersten Teil wurden Zellen aus DENA-induzierten HCC-Knoten von Wistar-Ratten (RccHan:WIST; $n = 2$) isoliert, einzelne Klone kultiviert und *in vitro* charakterisiert.

Im zweiten Teil wurden bestimmte der in Teil eins des Versuchs isolierten Zelllinien, basierend auf Unterschieden ihres *in-vitro*-Verhaltens, ausgewählt, zur Charakterisierung des metabolischen *in-vivo*-Verhaltens subkutan in Nacktratten (CrI:NIH-Foxn1^{tmu}; $n = 10$) implantiert und schließlich mittels Hyperpolarisations-MRS untersucht.

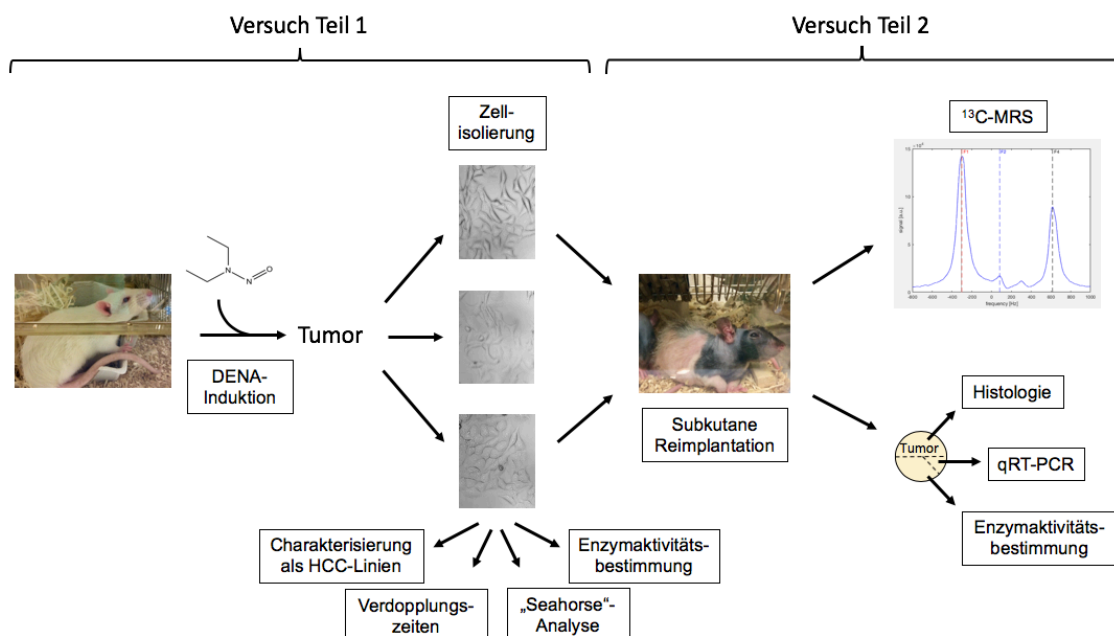


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Eine klinische Translation der Ergebnisse dieser Studie kann zum Fortschritt der personalisierten Medizin beitragen, indem spezifische Subtypen des HCCs mit unterschiedlichem metabolischem Verhalten identifiziert und einer gezielten Therapie zugänglich gemacht werden. Je genauer die Stoffwechselwege und deren Unterschiede zwischen Subtypen bekannt sind, umso besser können gezielt Inhibitoren von Schlüsselenzymen als neue Therapieoptionen entwickelt und kann die Therapie an die einzelnen Subtypen angepasst werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Hepatozelluläres Karzinom des Menschen

1.1. Ätiologie und Pathogenese

Grundsätzlich gilt, dass Personen mit einer Leberzirrhose ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HCCs aufweisen (Dhanasekaran, Limaye and Cabrera, 2012; op den Winkel *et al.*, 2012; Malek *et al.*, 2014; Galle *et al.*, 2018). Zu den Ursachen der Leberzirrhose zählen chronische Hepatitisvirus-Infektionen, Alkoholismus oder erblich bedingte Erkrankungen wie die Hämochromatose oder der α 1-Antitrypsin-Mangel (Dhanasekaran, Limaye and Cabrera, 2012; Galle *et al.*, 2018). Bei gewissen Risikofaktoren wie einer Hepatitis-B-Virus-Infektion oder nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) kann ein HCC aber auch ohne vorherige Entwicklung einer Leberzirrhose auftreten (Dhanasekaran, Limaye and Cabrera, 2012).

Hepatitis-B-Virus (HBV)

HBV wurde von der International Agency for Research on Cancer (IARC) 1994 als kanzerogen für den Menschen eingestuft (IARC, 1994). So kann bei fast allen HBV-Trägern mit hepatozellulären Karzinomen HBV-DNA im Lebergewebe nachgewiesen werden und schätzungsweise bis zu einem Viertel der Virus-Träger entwickeln im Laufe ihres Lebens ein hepatozelluläres Karzinom (McGlynn, Petrick and London, 2015). Als wichtigster Prädiktor für die Entwicklung eines HCCs gilt bei HBV-Infizierten eine hohe Viruslast (Chen *et al.*, 2006). Auch die HBV-Genotypen bedingen Unterschiede im Risiko für eine HCC-Entwicklung, wobei der Genotyp C mit einem höheren HCC-Risiko einhergeht als andere (McMahon, 2010).

Die chronische Leberschädigung bei einer HBV-Infektion durch Hepatitis und Zirrhose zieht Reparaturprozesse nach sich, durch welche vermehrt onkogene Mutationen auftreten. Diese sind genauso an der HCC-Entstehung beteiligt, wie die Integration von HBV-DNA in das Wirtsgenom, wenn es dadurch zur Aktivierung von Onkogenen im Wirt kommt. Die HBV-DNA-Integration in das Wirtsgenom ist dafür verantwortlich, dass das durch HBV-Infektion bedingte HCC auch in nicht zirrhotischen Lebern entstehen kann (But, Lai and Yuen, 2008).

Hepatitis-C-Virus (HCV)

Der Zusammenhang zwischen HCV-Infektion und HCC-Entstehung konnte erst ab dem Ende der 1980er Jahre mit der Entdeckung des Hepatitis-C-Virus (Choo *et al.*, 1989) und der damit verbundenen Nachweismöglichkeit von HCV-Infektionen gezeigt werden (Parkin, 2006). Ebenso wie HBV wurde auch HCV 1994 von der IARC als kanzerogen für den Menschen bewertet (IARC, 1994). Da es sich bei HCV allerdings um ein RNA-Virus handelt, findet hier keine Integration des Erbguts in das Wirtsgenom statt. Für die Pathogenese des HCV-assoziierten HCCs werden vor allem die mit chronischer Hepatitis, Fibrose, Regenerationsprozessen und Zirrhose verbundenen Vorgänge wie Hochregulierung inflammatorischer Zytokine und Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich gemacht (But, Lai and Yuen, 2008).

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)

Die steigende Zahl an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und metabolischem Syndrom sowie der damit verbundenen klinischen Manifestation der NAFLD spiegelt sich in einer erhöhten HCC-Inzidenz wider (Malek *et al.*, 2014; McGlynn, Petrick and London, 2015). Innerhalb der NAFLD stellt das Auftreten einer NASH das größte Risiko für die Entstehung eines HCCs dar, da hierbei zum einen das Risiko für eine progressive Leberfibrose und -zirrhose steigt, zum anderen aber auch proinflammatorische Prozesse, proonkogene Signale und epigenetische Veränderungen vorangetrieben werden, die zu einer HCC-Entwicklung ohne vorangegangene Zirrhose führen können (Dhanasekaran, Limaye and Cabrera, 2012).

Weitere Risikofaktoren

Alkoholismus und eine dadurch bedingte Leberzirrhose erhöhen das Risiko, an einem HCC zu erkranken (Galle *et al.*, 2018). Weitere Faktoren, die zu einem erhöhten HCC-Risiko beitragen, sind Tabak-Konsum (McGlynn, Petrick and London, 2015) und eine Humane-Immundefizienz-Virus-Infektion (Ioannou *et al.*, 2013). Auch Aflatoxin B1 gilt für die HCC-Entstehung sowohl als eigenständiger Risikofaktor als auch als Cofaktor bei chronischen HBV-Infektionen (Kensler *et al.*, 2011). Es findet sich vor allem in durch Pilze verunreinigten Nahrungsmitteln (Galle *et al.*, 2018).

Treffen unterschiedliche Risikofaktoren in einem Organismus zusammen, potenzieren sich diese oft, weshalb zum Beispiel die Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie,

Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten für alle Patienten mit einer Lebererkrankung Alkoholkarenz empfiehlt, um das HCC-Risiko nicht weiter zu erhöhen (Malek *et al.*, 2014).

Ebenso wie bei den geografischen Unterschieden in der Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms wiegen auch die einzelnen Ätiologien je nach Region unterschiedlich schwer. Während in den Gebieten mit hohen HCC-Inzidenzraten (Asien, Teile Afrikas) die HBV-Infektion und Aflatoxin-Aufnahme als bedeutendste Risikofaktoren gelten (Bray *et al.*, 2018), sind es in der westlichen Welt vor allem HCV-Infektionen, Alkoholismus und Übergewicht mit den damit verbundenen Erkrankungen Diabetes mellitus und metabolisches Syndrom (McGlynn, Petrick and London, 2015; Marengo, Rosso and Bugianesi, 2016). Dementsprechend erwiesen sich zum Beispiel in Deutschland Alkoholismus und HCV-Infektionen in einer Studie von op den Winkel *et al.* als Hauptursachen für eine HCC-Entstehung (op den Winkel *et al.*, 2012).

1.2. Überwachung von Risikopatienten

Zu den Risikopatienten, die überwacht werden sollen, gehören Patienten mit einer Leberzirrhose, ohne Leberzirrhose mit chronischer HBV- und/oder HCV-Infektion oder hohem HBV-DNA-Level sowie Patienten mit einem HCC-Hintergrund in der Familie und NAFLD (Jiang *et al.*, 2018). Die am weitesten verbreitete Methode zur Überwachung von Risikopatienten ist der Ultraschall mit einer Sensitivität von 58 bis 89 % und einer Spezifität von über 90 %. Eine Kombination mit der Ermittlung des Serumspiegels des Biomarkers Alpha-Fetoprotein bringt bei der Überwachung lediglich eine Erhöhung der Detektionsrate um 6 - 8 %, weshalb dieser zusätzliche Test auch aus Kosteneffizienzgründen nicht zur Überwachung empfohlen wird (Galle *et al.*, 2018). Als geeignetes Untersuchungsintervall für die Ultraschalluntersuchung werden 6 Monate angesehen. Bei der Feststellung von Knoten unter einem Zentimeter Durchmesser in Zirrhosepatienten empfiehlt sich im ersten Jahr eine Verkürzung des Intervalls auf 3 - 4 Monate. Knoten mit einer Größe von mehr als einem Zentimeter sollten der Diagnostik mit weiteren Bildgebungsmethoden oder einer Biopsie unterzogen werden (Jiang *et al.*, 2018).

1.3. Diagnostik

Für die Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung, welche bei pathognomonischem Befund zur Diagnostik

ausreichen. Ist dies nicht der Fall, kann gegebenenfalls auch eine histopathologische Untersuchung erfolgen. Letztere soll laut Leitlinie aber nur bei daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

1.3.1. Bildgebungsverfahren

Bei der Diagnostik mittels Bildgebung macht man sich die typische Vaskularisierung des HCCs als wesentliches Charakteristikum zu Nutze. Klassischerweise zeigt sich bei der kontrastmittelverstärkten Bildgebung eine arterielle Hypervaskularisation, gefolgt von einem zügigen sogenannten Wash-out (siehe Abb. 2), also einem schnelleren Auswaschen des Kontrastmittels aus dem Tumor im Vergleich zum umgebenden Leberparenchym bis zur Kontrastumkehr (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Ayuso *et al.*, 2018; Galle *et al.*, 2018). Der Nachweis dieser Kriterien gilt bei Risikopatienten (Leberzirrhose, chronische HBV-Infektion, NASH) als beweisend für ein hepatozelluläres Karzinom (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Für die Diagnostik bei Patienten ohne Leberzirrhose werden die gleichen Bildgebungsmerkmale herangezogen, wobei die Spezifität aufgrund der infrage kommenden Differentialdiagnosen geringer ist (Galle *et al.*, 2018).

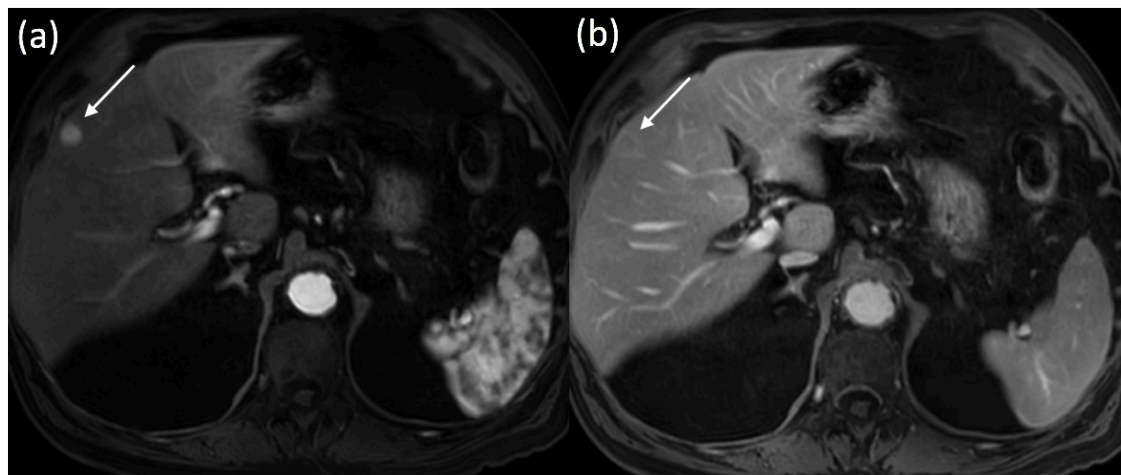


Abb. 2: Humanes hepatozelluläres Karzinom (Pfeil) mit (a) arterieller Hypervaskularisation und (b) dem sogenannten Wash-out in der späteren, portalvenösen Phase

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass HCCs in einem frühen Stadium der Hepatokarzinogenese aufgrund der noch nicht so weit fortgeschrittenen Angiogenese dieses typische Kontrastmittelverhalten häufig noch nicht zeigen (Matsui *et al.*, 2011; Ayuso *et al.*, 2018). In diesen Fällen kann eine Biopsie mit histopathologischer Untersuchung zur Diagnosefindung führen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Ayuso *et al.*, 2018).

Zu den grundsätzlich für die Diagnostik zur Verfügung stehenden Methoden zählen die kontrastmittelverstärkte MRT (CE-MRT), die kontrastmittelverstärkte CT (CE-CT) und der kontrastmittelverstärkte Ultraschall (CE-US). Allerdings empfehlen unterschiedliche Autoren, CE-US nicht für die HCC-Diagnostik zu verwenden, da sich bei dieser Technik hepatozelluläres Karzinom und intrahepatisches Cholangiokarzinom oft gleichen und so die Spezifität im Vergleich zu den anderen Methoden deutlich verringert ist (Vilana *et al.*, 2010; Galassi *et al.*, 2013; Galle *et al.*, 2018). Außerdem ist CE-US die am stärksten von der Untersucherexpertise abhängige Methode und durch die geringe Eindringtiefe bei gewissen physiologischen Gegebenheiten wie Fettleibigkeit oder tiefliegenden Tumoren limitiert (Mandai *et al.*, 2011; Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Galle *et al.*, 2018).

Auch in den Leitlinien der European Association for the Study of the Liver (EASL) und der American Association for the Study of the Liver Diseases (AASLD) wird wegen der höheren Sensitivität, der Erfassung der gesamten Leber und ähnlich guter Eignung beider Methoden CT oder MRT als jeweils erste zu verwendende Technik empfohlen (Galle *et al.*, 2018; Heimbach *et al.*, 2018).

Aubé *et al.* untersuchten in einer prospektiven, multizentrischen Studie die Eignung von CE-CT, CE-MRT und CE-US zur Diagnose von HCC. Bei Tumoren mit einer Größe von 10 - 20 mm ergaben sich eine Sensitivität von 70,6 % und eine Spezifität von 83,2 % für die MRT, 67,9 % und 76,8 % für die CT und 39,6 % und 92,9 % für den CE-US. Bei Tumoren mit einer Größe von 20 - 30 mm ergaben sich eine Sensitivität von 72,3 % und eine Spezifität von 89,4 % für die MRT, 71,6 % und 93,6 % für die CT und 52,9 % und 91,5 % für den CE-US (Aubé *et al.*, 2017).

1.3.2. Histopathologische Diagnostik

Die Biopsie wird gerade bei kleinen Läsionen (< 2 cm) oft zur Diagnosestellung eingesetzt, weil bei diesen das typische Bildgebungsverhalten seltener nachgewiesen

werden kann (Bolondi *et al.*, 2005). Meist wird bei unklarem Befund zunächst eine erneute Bildgebung im Verlauf bzw. eine zweite Bildgebungsmodalität durchgeführt. Sersté *et al.* kommen in ihrer Studie dagegen zu dem Schluss, dass bei einem unklaren ersten Bildgebungsbefund statt einer zweiten Bildgebungsmethode, wobei es nämlich zu einem starken Sensitivitätsverlust kommt, eine Biopsie durchgeführt werden soll (Sersté *et al.*, 2012).

Durch die histopathologische Untersuchung, welche nach den aktuellen Kriterien der WHO erfolgen soll, kann zwischen HCC und anderen primären (z.B. ICC) und sekundären Lebertumoren (z.B. Bronchialkarzinometastasen) differenziert werden. Bei schlecht differenzierten, soliden Karzinomen, bei Mischtumoren oder bei der Unterscheidung von frühen, hochdifferenzierten HCCs und dysplastischen Knoten kann eine immunhistochemische Färbung zusätzliche Erkenntnisse bringen (Galle *et al.*, 2018).

1.3.3. Diagnosealgorithmus in Deutschland

Nachfolgende Abbildung (siehe Abb. 3) zeigt den empfohlenen Diagnosealgorithmus bei malignitätsverdächtigen Lebertumoren laut Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

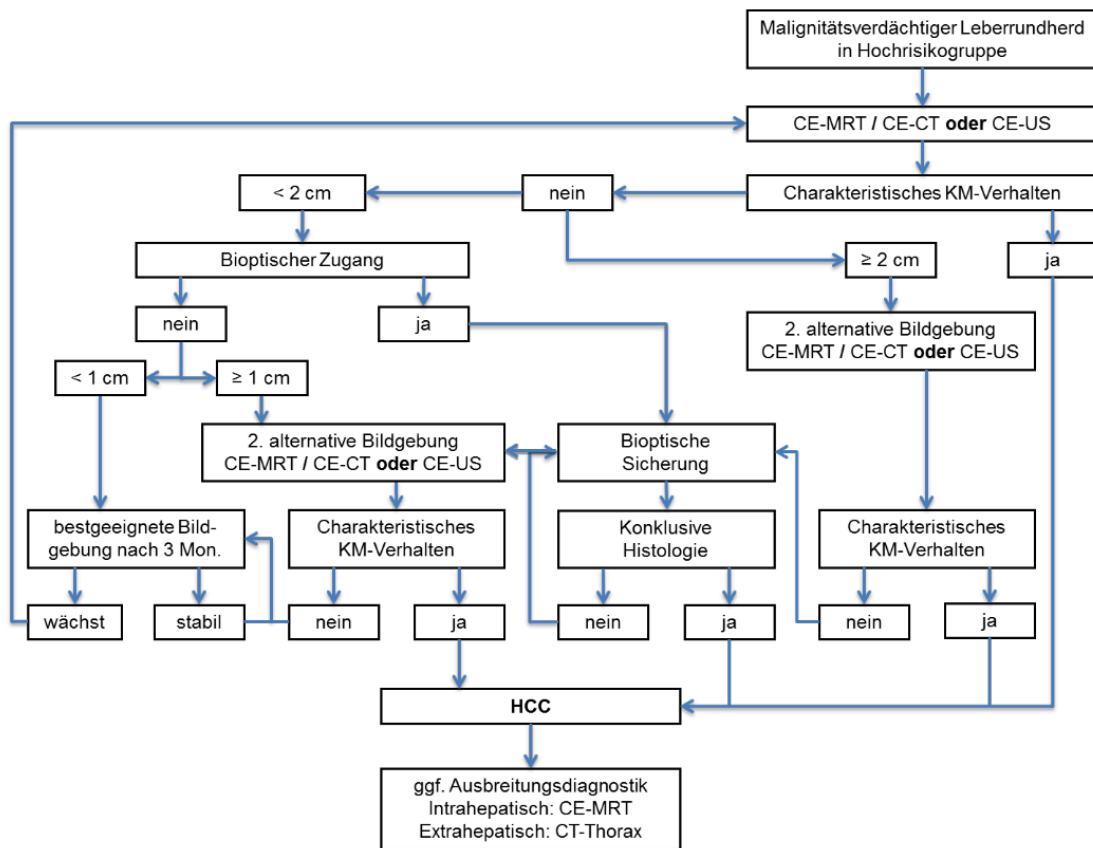


Abb. 3: Diagnosealgorithmus des Leitlinienprogramms Onkologie bei malignitätsverdächtigen Lebertumören (Abgebildet mit freundlicher Genehmigung des Leitlinienprogramms Onkologie); CE-MRT: contrast-enhanced MRT; CE-CT: contrast-enhanced CT; CE-US: contrast-enhanced Ultrasound; KM: Kontrastmittel

1.4. Biomarker in der Bildgebung

Die Möglichkeiten der Bildgebungsverfahren sind nicht auf eine rein qualitative Diagnose (HCC ja/nein) beschränkt, sondern können zusätzliche Informationen mit prognostischem oder therapeutischem Wert geben. Diese Informationen sind entweder bereits in den Bilddaten zur Diagnosestellung mit enthalten oder werden durch zusätzliche Untersuchungsverfahren gewonnen.

Allein die Größe des Tumors lässt bereits bestimmte Schlüsse zu, da größere Tumore mit einer schlechteren Überlebensrate und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der vaskulären Infiltration und extrahepatischen Metastasierung einhergehen. Die Tumorgöße und -anzahl haben Einfluss auf die Durchführbarkeit und den zu

erwartenden Erfolg der im nächsten Kapitel geschilderten Therapieoptionen, wobei kleinere Tumore bessere Therapieoptionen aufweisen (Cho and Choi, 2015).

Von Satellitenknoten spricht man bei Tumorzellansammlungen, die um den Haupttumor angeordnet sind und durch Gefäßinvasion entstandene intrahepatische Metastasen darstellen (Cong *et al.*, 2016). Nach einer Studie von Kim *et al.* zeigt das Vorhandensein von Satellitenknoten eine negative Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben der Patienten (Kim *et al.*, 2011).

Bei der kontrastmittelverstärkten Bildgebung kann sich eine in der portalvenösen Phase oder der Spätphase hyperintense Umrandung des Tumors zeigen (Choi, Lee and Sirlin, 2014). Das Sichtbarwerden einer solchen Kapsel in der Bildgebung deutet auf das Vorliegen eines fortgeschrittenen HCCs hin, da frühe HCCs, zirrhotische und dysplastische Knoten nur sehr selten eine Kapsel aufweisen. Zeigt sich eine inkomplette Kapsel ist dies ein Hinweis auf Infiltration in das umgebende Gewebe und mikrovaskuläre Invasion der Tumorzellen in tumorale oder peritumorale Gefäße - ein Indikator für eine schlechte Prognose (Jiang *et al.*, 2018).

Bei der diffusionsgewichteten Bildgebung (DWI) macht man sich die Beurteilung der brownischen Molekularbewegung von Wassermolekülen im Gewebe zunutze, um die Diffusion im Gewebe zu untersuchen. Beispielsweise wird in Geweben mit einer hohen Zelldichte die Diffusion von Wassermolekülen eingeschränkt. Diese Einschränkung der Bewegung resultiert im Gegensatz zu nicht/wenig eingeschränkter Diffusion mit geringer Signalintensität bei dieser Bildgebung in einer hohen Signalintensität. Durch die Generierung des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC) und Erstellung einer ADC-Karte (siehe Abb. 4) kann die Diffusionseinschränkung quantifiziert werden. Hierbei ergibt eine eingeschränkte Diffusion niedrige ADC-Werte und eine freie Diffusion hohe Werte (Vu, Morelli and Szklaruk, 2017). Jiang *et al.* zeigten in ihrer Studie zur Anwendung von qualitativer und quantitativer DWI beim hepatozellulären Karzinom, dass durch die Beurteilung der Signalintensität der DWI eine Unterscheidung zwischen gut und mäßig bis schlecht differenziertem HCC (histologisches Grading) möglich war. Die mittleren ADC-Werte erlaubten sogar die Differenzierung von allen drei Typen, woraus sie schlossen, dass die DWI eine präoperative, nicht-invasive Abschätzung des histologischen Grades erlaubt (Jiang *et al.*, 2017). Der mittlere ADC-Wert kann aber auch zur Einschätzung des Therapieansprechens genutzt werden. So ergab eine Studie von Yuan *et al.*, dass bei HCCs ein hoher Ausgangs-ADC-Wert für ein schlechtes Therapieansprechen auf eine Chemoembolisation spricht (Yuan *et al.*,

2010). Darüber hinaus kann die DWI auch für Prognosen über die mikrovaskuläre Infiltration im HCC herangezogen werden, die einen wichtigen Anhaltspunkt für die Rezidiventstehung nach einer Resektion oder Lebertransplantation darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass HCCs mit mikrovaskulärer Infiltration eine höhere Signalintensität in der DWI und niedrigere ADC-Werte zeigten als HCCs ohne mikrovaskuläre Infiltration (Suh *et al.*, 2012).

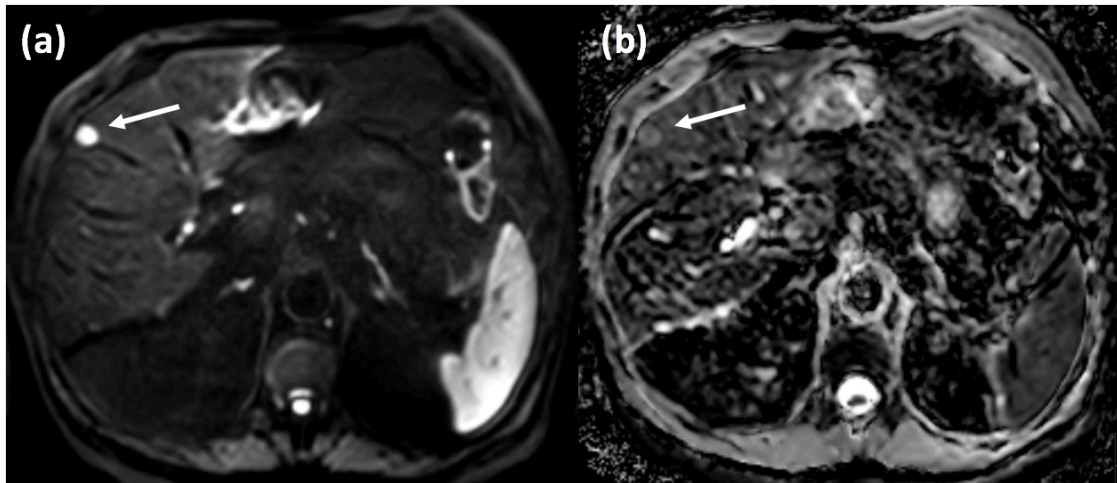


Abb. 4: Humanes hepatozelluläres Karzinom (mit Pfeil markiert) (a) in der DWI und (b) die dazugehörige ADC-Karte

Die dynamische kontrastmittelverstärkte Bildgebung (DCE-MRT) wird dagegen zur Untersuchung der Perfusion genutzt. Dazu werden vor, während und nach der Verabreichung eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels im Abstand von wenigen Sekunden wiederholt Bilddatensätze vom Tumor und der Leber generiert. So kann mit den Bilddatensätzen die Anflutung des Kontrastmittels im zeitlichen Verlauf beurteilt werden, welche sich aus den Gegebenheiten der Gefäßversorgung ergibt (Ippolito *et al.*, 2018). Das Kontrastmittel verlässt die Gefäße auch in den Extrazellularraum, was Aussagen über die Permeabilität der Gefäße und den Blutfluss zulässt. Die Auswertung der DCE-MRT kann semiquantitativ oder quantitativ erfolgen. Bei der semiquantitativen Auswertung werden alle Parameter direkt der Signalintensitätskurve im zeitlichen Verlauf entnommen. Bei der quantitativen Analyse werden dagegen unterschiedliche pharmakokinetische Modelle herangezogen. Dies ermöglicht beispielsweise die Untersuchung von Änderungen der quantitativen Parameter im Verlauf einer anti-angiogenetischen Therapie, wodurch Rückschlüsse auf das Therapieansprechen möglich sind

(Chen and Shih, 2014). So zeigten Zhu *et al.* in ihrer Studie, dass eine Behandlung mit dem anti-VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib zu einem signifikanten Abfall der Parameter K^{trans} und K_{ep} führt und dieser Abfall bei Patienten mit teilweisem Therapieansprechen oder Stabilität der Krankheit deutlich stärker ausfiel als bei Patienten mit Krankheitsprogress (K^{trans} und K_{ep} sind Konstanten, die den Übertritt des Kontrastmittels von Gefäßen in den Extrazellularraum (K^{trans}) und umgekehrt (K_{ep}) definieren) (Zhu *et al.*, 2009).

Die Positronenemissionstomographie (PET) mit dem radioaktiv markierten Glukose-Analogon [^{18}F]Fluorodesoxyglukose (FDG) ist eine metabolische Bildgebungsmethode (siehe Kapitel II. 4. 2.). Sie eignet sich aufgrund der FDG-Aufnahme von nur weniger als 40 % der HCCs nicht als Methode zur Diagnose. Eine FDG-Aufnahme des Tumors ist aber mit einer schlechten Prognose, erhöhtem Serum-alpha-Fetoprotein und vaskulärer Invasion verbunden. Somit ermöglichen die Ergebnisse des ^{18}F FDG-PETs prognostische Aussagen über ein vorliegendes HCC (Galle *et al.*, 2018).

Die genannten Biomarker helfen, die Aussagen über ein vorliegendes HCC zu präzisieren. Es bedarf aber zum Teil der weiteren Evaluation der Bedeutung dieser Biomarker sowie der Verbesserung bestehender und Entwicklung weiterer Techniken zur immer detaillierteren Charakterisierung dieser Tumore.

1.5. Therapieoptionen

Im Moment stehen für das hepatozelluläre Karzinom mehrere Standardtherapiemethoden zur Verfügung, über die nachfolgend ein kurzer Überblick gegeben werden soll. Die Entscheidung, welche Therapie anzuwenden ist, richtet sich neben dem Tumorstadium auch nach der Leberfunktion und dem Allgemeinzustand des Patienten. Dies geschieht anhand der Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation. Was in dieser Arbeit als Standardtherapie aufgeführt wird, richtet sich nach der EASL-Leitlinie und der des Leitlinienprogramms Onkologie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Galle *et al.*, 2018).

Eine kurative Therapie kann durch eine Lebertransplantation, eine chirurgische Resektion und lokal ablativ Verfahren wie die Radiofrequenzablation oder Mikrowellenablation erfolgen. Generell sind diese Therapieformen für Patienten in einem frühen Krankheitsstadium mit gut erhaltener Leberfunktion geeignet. Durch eine Lebertransplantation kann zusätzlich zur HCC-Therapie eine vorhandene Leberzirrhose

therapiert werden. Bei der Transplantation darf aber ebenfalls kein weit fortgeschrittenes HCC vorliegen. Ausschlusskriterien für eine Lebertransplantation sind unter anderem eine makrovaskuläre Infiltration oder Fernmetastasierung. Die Beurteilung der Eignung von Patienten für eine Lebertransplantation erfolgt nach den sogenannten Milan-Kriterien. Für Patienten, bei denen ein kuratives Verfahren nicht in Frage kommt, die aber keine extrahepatische Metastasierung und eine gute Leberfunktion aufweisen, wird eine transarterielle Chemoembolisation (TACE) empfohlen, bei der möglichst selektiv das tumorversorgende Gefäß nach Applikation eines Chemotherapeutikums verschlossen wird und so durch einen zytotoxischen und ischämischen Effekt eine Tumornekrose ausgelöst werden soll. Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) dar, bei der Mikrosphären mit radioaktiven Substanzen (z.B. der β -Strahler Yttrium-90) über die Leberarterie appliziert werden und lokal im Tumorgebiet wirken sollen. Ist aufgrund von Ausschlusskriterien wie einer extrahepatischen Tumormanifestation oder einem lokoregionär nicht kontrollierbaren HCC auch eine transarterielle Chemoembolisation oder SIRT für den Patienten nicht geeignet, wird eine systemische Therapie mit dem oral verabreichten Multikinaseinhibitor Sorafenib vorgeschlagen. (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Galle *et al.*, 2018).

Generell bleibt festzuhalten, dass von einer besseren Prognose und einem größeren Therapieerfolg auszugehen ist, je früher der Tumor entdeckt wird, weshalb der Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden zur Früherkennung von hepatozellulären Karzinomen eine wichtige Bedeutung zukommt.

1.6. Patientenüberwachung nach der Therapie

Bei einer Resektion oder Radiofrequenzablation erfolgt eine erste Untersuchung zur Ermittlung des Therapieansprechens nach vier Wochen. Dann werden für einen Zeitraum von zwei Jahren dynamische CT- oder MRT-Studien mit einem Untersuchungsintervall von drei Monaten durchgeführt. Anschließend verlängert sich das Untersuchungsintervall auf sechs Monate. Bei Auftreten eines Rezidivs soll der Patient erneut nach den BCLC-Kriterien beurteilt und auf Grundlage dieser Beurteilung das weitere therapeutische Vorgehen geplant werden. Bei einer Lebertransplantation findet die erste Untersuchung zur Beurteilung des Therapieansprechens nach drei Monaten statt und die weitere Überwachung alle sechs Monate. Früh erkannte Rezidive können in bis zu einem Drittel der Fälle in kurativer Intention mit einer ablativen Therapie

behandelt werden. Die initiale Ermittlung des Therapieansprechens nach vier Wochen wird bei Patienten, die eine TACE erhalten haben, von Untersuchungen (einschließlich der klinischen Untersuchung auf eine Leberdekomensation) im Intervall von drei Monaten ergänzt. Patienten unter Sorafenib-Therapie sollen alle zwei bis drei Monate untersucht werden (Arora and Kumar, 2014).

2. Tumormetabolismus

2.1. Besonderheiten des Tumormetabolismus

Der Metabolismus von Tumorzellen unterscheidet sich wesentlich von dem gesunder Säugetierzellen, deren unkontrollierte Proliferation durch verschiedene Kontrollsysteme wie eine Nährstoffaufnahme erst nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren verhindert wird. Durch genetische Mutationen verlieren Tumorzellen diese Abhängigkeit und es findet eine Anpassung des Metabolismus an die Bedürfnisse proliferierender Zellen statt (Vander Heiden, Cantley and Thompson, 2009). Die Abweichungen des Tumorzellmetabolismus betreffen sowohl die Nährstoffaufnahme, die Stoffwechselwege, denen die verschiedenen Metaboliten zugeführt werden als auch die Funktion der Zellen selbst und derer in ihrer Umgebung (Pavlova and Thompson, 2016).

Die von der Tumorzelle aufgenommenen Nährstoffe müssen den Bedarf zur Synthese von Biomasse decken. Hierbei seien vor allem Glukose und Glutamin genannt, welche zu den wichtigsten verstoffwechselten Molekülen gehören. Ihr Metabolismus liefert Bausteine wie Kohlenstoff und Stickstoff, Energie sowie Reduktionsäquivalente für die Biosynthese anderer Moleküle (Vander Heiden, Cantley and Thompson, 2009; Pavlova and Thompson, 2016). Die Glukoseaufnahme in die Zelle wird vor allem durch den PI3K-Akt-Signalweg reguliert, bei dessen Aktivierung durch onkogene Mutationen die Expression des Glukosetransporters GLUT1 gesteigert wird und über eine erhöhte Hexokinaseaktivität (Phosphorylierung der Glukose) sowie Phosphofruktokinaseaktivität (Katalyse des irreversiblen Glykolyse-schrittes) der Efflux von Glukose aus der Zelle verhindert wird (Gottlob *et al.*, 2001; Wieman, Wofford and Rathmell, 2007). Die onkogenen Proteine Src und Ras führen ebenfalls zu einer erhöhten GLUT1-mRNA-Expression (Murakami *et al.*, 1992). Der Transkriptionsfaktor c-Myc steigert die Glutaminaufnahme und -nutzung durch eine vermehrte Expression von

Glutamintransportern (ASCT2, SN2) und Glutamin-verstoffwechselnden Enzymen (GLS1, PRPS2, CAD) (Gao *et al.*, 2009; Pavlova and Thompson, 2016). Zusätzlich bewirkt eine Deletion der negativ regulatorisch wirkenden Familie der Rb-Tumorsuppressor-Proteine eine E2F-abhängige, gesteigerte ASCT2- und GLS1-Expression (Reynolds *et al.*, 2014). Der durch eine vermehrte Aufnahme und Verstoffwechselung von Glutamin zur Verfügung stehende Stickstoff wird unter anderem für die Biosynthese von Nukleotiden und nicht essentiellen Aminosäuren verwendet (Pavlova and Thompson, 2016).

Des Weiteren ermöglicht das mutierte Protein Ras den Tumorzellen, extrazelluläre Proteine aufzunehmen und diese über lysosomalen Abbau als Quellen für Aminosäuren zu nutzen (Commisso *et al.*, 2013). Auch die Aufnahme von Fettsäuren aus der Umgebung statt eigener Synthese ist verschiedenen Krebszellen möglich. Mit diesen Mechanismen gleichen sie eine mangelhafte Nährstoffversorgung über das Blutgefäßsystem aus (Pavlova and Thompson, 2016).

Da proliferierende Zellen bei der Biosynthese mehr Molekülbausteine und Reduktionsäquivalente als ATP benötigen, werden andere Stoffwechselwege als solche zur maximalen ATP-Bildung bevorzugt. Deshalb werden Zwischenprodukte der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus abgezweigt und zur Produktion von verschiedenen Biomolekülen und dem Reduktionsäquivalent NADPH, welches durch andere Stoffwechselwege als NADH gebildet und bei vielen biosynthetischen Prozessen benötigt wird, verwendet. Dies gelingt durch die in vielen Tumorarten vorhandene gesteigerte Aktivität der Enzyme, welche für derartige Abzweigungen limitierend sind (Vander Heiden, Cantley and Thompson, 2009; Pavlova and Thompson, 2016). Beispielsweise wird Glukose-6-phosphat, gebildet durch den ersten Schritt der Glykolyse, dem Pentosephosphatweg, dessen Schlüsselenzyme Transketolase-like-1 und Transaldolase in verschiedenen Krebszellen überexprimiert sind, zugeführt und dient so der Bildung von NADPH und Ribose-5-phosphat (Xu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Ribose-5-phosphat wird zur Synthese von Nukleotiden benötigt. Bei dieser Verlagerung des Stoffwechsels spielt Ras wieder eine fördernde Rolle (Ying *et al.*, 2012). Auch weitere Glykolysezwischenprodukte werden zur Biosynthese von Makromolekülen aus der Glykolyse abgezweigt. Fruktose-6-phosphat dient der Bildung von Makromolekülen wie Heparansulfat und Hyaluronsäure, Dihydroxyacetonphosphat der Synthese von Phospholipiden und 3-Phosphoglycerat der Bildung von Serin, Glycin, NADPH und der Bereitstellung von Methylendonorguppen (Pavlova and Thompson,

2016). Serin wiederum speist den C1- oder Folatkreislauf, durch welchen Tetrahydrofolat-Kohlenstoffverbindungen entstehen, die dann unter anderem der Biosynthese von Purinen, Thymidin und ebenfalls der NADPH-Bildung dienen (Fan *et al.*, 2014). Der letzte Schritt der Glykolyse von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat wird von der Pyruvatkinase katalysiert. Tumorzellen exprimieren die stark regulierte Isoform PKM2, die hauptsächlich in der wenig aktiven dimeren Form vorliegt und so zu einer Anhäufung von Glykolysezwischenprodukten führt. Serin stellt einen Aktivator von PKM2 dar, d. h. ein gesättigter Serinpool führt zu einer vermehrten Pyruvatbildung. Durch PKM2 wird also das Gleichgewicht zwischen Anhäufung von Zwischenprodukten der Glykolyse und Bildung und Weiterverstoffwechselung von Pyruvat gehalten (Ye *et al.*, 2012). Ein Großteil des gebildeten Pyruvats wird bevorzugt zu Laktat umgesetzt. Dieser geänderte Kohlenstoffmetabolismus stellt einen Teil der Erklärung für den sogenannten Warburg-Effekt (siehe Kapitel II. 2. 2.) dar. Durch eine verstärkte Umsetzung von Pyruvat zu Laktat wird verhindert, dass eine Ansammlung von NADH im Zytosol und eine daraus resultierende starke ATP-Bildung durch Rückkopplungshemmung den Glukosemetabolismus und so die Bereitstellung von Bausteinen zur Biosynthese hemmt (Pavlova and Thompson, 2016). Auch Citratzyklus-Zwischenprodukte werden für biosynthetische Prozesse verwendet. Das in vielen Tumorzellen überexprimierte erste Schlüsselenzym der Lipogenese, die ATP-Citrat-Lyase (ACLY), katalysiert die Bildung von Acetyl-CoA aus Citrat und ermöglicht so die gesteigerte *de-novo*-Lipidsynthese. An der Hochregulierung dieses Enzyms ist der PI3K-Akt-Signalweg beteiligt (Migita *et al.*, 2008). Da in Tumorzellen ein großer Teil des aus der Glykolyse stammenden Pyruvats zu Laktat umgewandelt und so nicht dem Citrat-Zyklus zugeführt wird, wird Acetyl-CoA auch über α -Ketoglutarat gebildet, welches aus dem Glutaminmetabolismus hervorgeht (Metallo *et al.*, 2012).

Acetyl-CoA dient aber nicht nur als Baustein bei der Biosynthese, sondern ist auch Substrat zur Acetylierung von Histonen und somit wichtiger Bestandteil der Metaboliten-regulierten epigenetischen Reprogrammierung in Tumorzellen. Die Akt-abhängig Hochregulierung der ACLY sorgt für eine hohe Produktion von Acetyl-CoA. ACLY ist somit nicht nur ein Schlüsselenzym der Lipogenese, sondern fördert auch die Histonacetylierung in den Zellen (Lee *et al.*, 2014). S-Adenosylmethionin, ein Produkt des oben beschriebenen, durch Serin gespeisten C1-Stoffwechselweges, beeinflusst als Methylgruppendonator für die Methylierung von Histonen, DNA und mRNA ebenfalls die epigenetische und posttranskriptionale Reprogrammierung. Zahlreiche posttrans-

kriptionale Modifikationen werden von α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen katalysiert. Der in der Zelle vorliegende Spiegel dieses Metaboliten hat somit auch direkten Einfluss auf die posttranskriptionalen Modifikationen (Pavlova and Thompson, 2016).

Der geänderte Metabolismus in Tumorzellen beeinflusst nicht nur die Zelle selbst, sondern auch andere Zellen und Strukturen in ihrer Umgebung. Hierzu gehören beispielsweise Einflüsse auf die Immunabwehr oder die Angiogenese. Viele dieser Auswirkungen sind durch die verstärkte Laktatproduktion der Tumorzelle begründet und werden in nachfolgendem Kapitel näher erläutert.

2.2. Die Bedeutung von Laktat im Tumor

Otto Warburg entdeckte in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, dass viele Krebszellen trotz ausreichender Sauerstoffversorgung Laktat produzieren, statt Glukose mittels oxidativer Phosphorylierung zu verstoffwechseln (Warburg O, Posener K und Negelein E, 1924). Dass eine mikroregionale, hohe Laktatkonzentration unabhängig von Hypoxie ist, zeigten auch Yaromina *et al.* (Yaromina *et al.*, 2009). Mittlerweile verdichten sich die Hinweise, dass die zunächst ineffektiver erscheinende aerobe Glykolyse und die damit verbundene erhöhte Laktatproduktion, der sogenannte Warburg-Effekt, für die Tumorzellen zu Selektionsvorteilen führt und diese erhöhte Laktatproduktion in Tumorzellen deshalb nicht nur einen Nebeneffekt darstellt, sondern eine zentrale Rolle in der Karzinogenese einnimmt (San-Millán and Brooks, 2017).

Der Warburg-Effekt beruht unter anderem auf der Überexpression von Metabolitentransportern und glykolytischen Enzymen (Hirschhaeuser, Sattler and Mueller-Klieser, 2011). Hierbei spielen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Das Onkogenprodukt c-Myc aktiviert beispielsweise durch direkte Bindung an dafür kodierende Gene die Expression von glykolytischen Enzymen wie der Enolase und der Laktatdehydrogenase A (LDH A), die in Tumorzellen exprimierte LDH-Isoform, welche die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat katalysiert (Shim *et al.*, 1997; San-Millán and Brooks, 2017). Der ebenfalls als Transkriptionsfaktor fungierende Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α) wird von den Glykolyseprodukten Pyruvat und Laktat stabilisiert (Lu, Forbes and Verma, 2002) und bewirkt eine erhöhte Transkription von LDH A sowie der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), welche einen negativen

Regulator bei der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvatdehydrogenase darstellt (Papandreou *et al.*, 2006). Zu den durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflussten Proteinen gehört auch der Monocarboxylat-Transporter 4 (MCT4), der durch den Protonen-gekoppelten Transport neben der Abgabe des produzierten Laktats aus der Zelle eine extrazelluläre Ansäuerung bewirkt (Hirschhaeuser, Sattler and Mueller-Klieser, 2011; Faubert *et al.*, 2017). Dadurch werden aktivierte zytotoxische T-Zellen, welche Tumorzellen erkennen und durch Freisetzung von proapoptotischen und zytotoxischen Substanzen abtöten, in ihrem Metabolismus und der Zytokinproduktion stark gestört. Diese T-Zellen generieren Energie ebenfalls hauptsächlich durch die Glykolyse mit anschließender Laktatbildung und können dann ihr produziertes Laktat nicht mehr in den Extrazellularraum abgeben, da dieser Transport vom vorliegenden Konzentrationsgradienten abhängt und durch die hohe Laktatproduktion der Tumorzellen blockiert wird (Fischer *et al.*, 2007). Auch Goetze *et al.* konnten einen inhibitorischen Effekt von exogenem Laktat auf Komponenten des Immunsystems zeigen: Die Zytokinsekretion und Migration von Monozyten wird durch das Laktat inhibiert, die Motilität von verschiedenen Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien dagegen konzentrationsabhängig signifikant gesteigert (Goetze *et al.*, 2011). Auch die tumorspezifische Isoform M2 der Pyruvatkinase (PKM2) ist durch die Regulation der Pyruvatbildung maßgeblich am Auftreten des Warburg-Effektes beteiligt und bewirkt einen selektiven Wachstumsvorteil der Tumorzellen (Christofk *et al.*, 2008). Des Weiteren löst Laktat unabhängig vom Vorliegen hypoxischer Bedingungen eine erhöhte Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Produktion in Endothelzellen und dadurch eine verstärkte Endothelzellmigration aus und beeinflusst so die für die Karzinogenese wichtige Angiogenese (Beckert *et al.*, 2006). Fibroblasten in der Umgebung der Tumorzellen werden durch einen erhöhten Laktatspiegel zur Hyaluronsäureproduktion angeregt, was vermutlich zur Invasivität des Tumors beiträgt (Stern *et al.*, 2002).

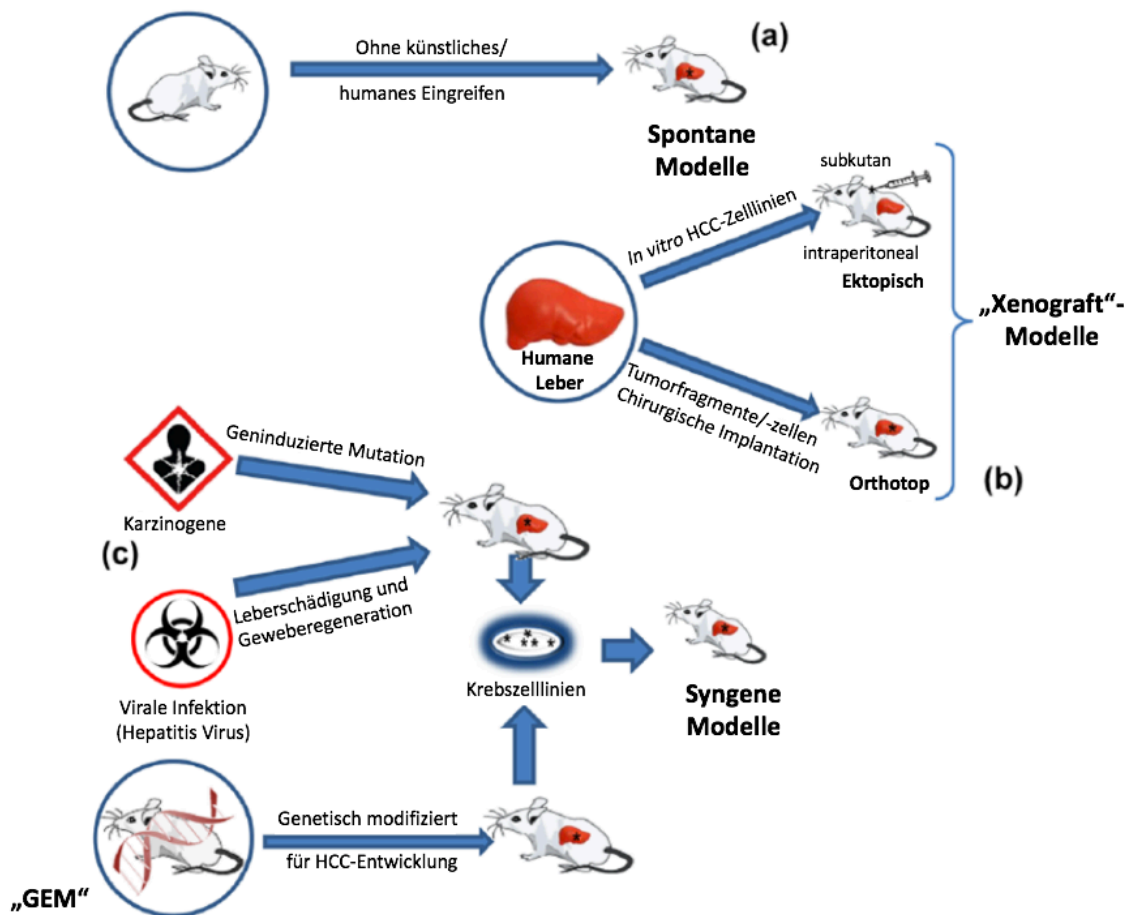
Es konnte nicht nur in der präklinischen Forschung, sondern auch in klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen einer hohen Laktatkonzentration und einem Selektionsvorteil für Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine hohe Laktatkonzentration im Tumor korreliert sowohl mit einer schlechteren Lebenserwartung als auch mit einem vermehrten Auftreten von Metastasen, wobei sich Tumore des gleichen Stadiums und Gradings in ihrem Laktatmetabolismus zum Teil unterschiedlich verhielten (Walenta *et al.*, 2000; Brizel *et al.*, 2001; Walenta and Mueller-Klieser, 2004).

Somit wird deutlich, dass ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer Methoden

besteht, mit denen das metabolische Verhalten von Tumoren in Bezug auf Laktat frühzeitig quantitativ dargestellt und auch während einer Therapie überwacht werden kann, um so Aussagen über das Therapieansprechen und eine mögliche Prognose treffen zu können.

3. Tiermodelle des hepatozellulären Karzinoms

In der Forschung stellen Tiermodelle ein wichtiges Instrument zur Untersuchung komplexer Fragestellungen dar, die nicht durch andere Modelle (z.B. *in vitro*) geklärt werden können. Dies gilt auch für die HCC-Forschung, in der verschiedene Tiermodelle (vor allem Nagetiere wie Maus und Ratte) zur Verfügung stehen. Spontane Modelle kommen nur sehr selten vor. Experimentell induzierte Modelle lassen sich nach Santos *et al.* einteilen in chemisch induzierte Modelle, implantierte Modelle, virale Modelle und genetisch modifizierte Mausmodelle (GEM). Abbildung 5 zeigt nicht nur einen Überblick über die Modelle, sondern auch, wie verschiedene Modelle ineinander greifen (z.B. chemisch induzierte Modelle, aus denen Tumorzellen isoliert und reimplantiert werden) (Santos, Colaço and Oliveira, 2017).



Quelle: Santos, N. P., Colaço, A. A. and Oliveira, P. A. (2017) 'Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review', *Tumor Biology*, 39(3), p. 3. doi: 10.1177/1010428317695923.

Abb. 5: Übersicht über die Tiermodelle des hepatozellulären Karzinoms: (a) spontane Modelle, (b) „Xenograft“-Modelle und (c) syngene Modelle nach Santos, Colaço und Oliveira (2017), übersetzt aus dem Englischen; „GEM“: *genetic engineered mouse model*

Die chemisch induzierten Modelle lassen sich in drei Entwicklungsstufen einteilen: die Initiation, die Promotion und die Progression. Man unterscheidet auch bei den verwendeten Substanzen je nach Wirkung unterschiedliche Gruppen (Dragan *et al.*, 1993). Zur Erzeugung chemisch induzierter HCC-Modelle werden oft Initiator-Substanzen in Kombination mit Promotoren oder Initiatoren alleine über einen längeren Zeitraum eingesetzt (Newell *et al.*, 2008). Die Wirkung der genotoxischen Substanzen (Initiatoren) beruht auf der direkten Einwirkung auf die DNA, beispielsweise durch die Entstehung von DNA-Addukten oder Strangbrüchen. Hierzu zählen unter anderem Diethylnitrosamin (DEN) oder Aflatoxin B1. Die Promotoren dagegen besitzen keine direkte genotoxische Wirkung, sondern steigern zum Beispiel die Proliferation und so die Wahrscheinlichkeit des Auftretens und Anhäufens von Mutationen. Vertreter dieser

Gruppe sind Phenobarbital und Tamoxifen (Ono *et al.*, 2014).

Diethylnitrosamin ist eine der am häufigsten eingesetzten Chemikalien und führt von einer Leberschädigung über Fibrose und Zirrhose zur HCC-Entwicklung (Santos, Colaço and Oliveira, 2017). Durch eine Sauerstoff- und NADPH-abhängige Biotransformation, katalysiert von Cytochrom-P450-Isoenzymen, wird α -Hydroxyl-nitrosamin gebildet. Aus diesem entsteht durch die Abspaltung von Acetaldehyd ein elektrophiles Ethyldiazoniumion, welches mit Nukleophilen wie den DNA-Basen reagiert, wodurch es zur DNA-Schädigung kommt (Verna, Whysner and Williams, 1996; Heindryckx, Colle and Van Vlierberghe, 2009). Des Weiteren kommt es durch das P450-abhängige Enzymsystem zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen, die zusätzlich Schädigungen von DNA, Proteinen und Fetten verursachen (Heindryckx, Colle and Van Vlierberghe, 2009). Können die DNA-Schäden durch enzymatische Reparatursysteme nicht repariert werden, führt dies häufig zur Initiation der Karzinogenese (Oliveira *et al.*, 2007). Histopathologisch findet sich beim DENA-induzierten Modell eine verstärkte Fibrose der Leber sowie vermehrte Mitosen und eine Gallengangshyperplasie als Zeichen vermehrter Regenerationsprozesse in der Leber. Außerdem zeigt sich eine zytoplasmatische Vakuolisierung und Verfettung der Hepatozyten, das Auftreten von veränderten Bereichen (sogenannten „foci of cellular alteration“) und eine intralobuläre Makrophageninfiltration als Spiegel einer chronischen Leberschädigung. Die entstehenden Tumore weisen unterschiedliche Wachstumsmuster auf und spiegeln so die Heterogenität humaner HCCs wider (Groß *et al.*, 2015).

Bei den implantierten Modellen unterscheidet man Implantationen artgleicher und artfremder Zellen oder Gewebe. Hierbei können zum Beispiel gut charakterisierte, kommerziell erwerbliche Zelllinien, frisch aus Tumoren isolierte Zellen oder Tumorteilstücke verwendet werden. Bei der Implantation artgleicher Zellen unterscheidet man weiterhin syngene und allogene Modelle. Bei syngenischen Modellen werden Zellen des genetisch gleichen Hintergrundes implantiert, wie es zum Beispiel bei isolierten Zellen desselben Inzuchtstammes der Fall ist. Bei allogenen Zellen handelt es sich um artgleiche Zellen mit einem genetisch verschiedenen Hintergrund (GV-SOLAS, 2009). Bei der Implantation artfremder Zellen wie humaner Zellen in Nagetiere werden sogenannte „Xenograft“-Modelle erzeugt. Um eine Abstoßung des implantierten Gewebes zu verhindern, werden hierfür immunsupprimierte Tiere wie thymuslose Nacktratten und -mäuse oder SCID-Mäuse eingesetzt (Kramer *et al.*, 2005).

Welches Modell sich am besten eignet, ergibt sich aus dem Versuchszweck. Um beispielsweise den Einfluss des Immunsystems auf den Tumor zu untersuchen oder immunmodulierende Therapien zu testen, sollten syngene oder allogene Modelle mit immunkompetenten Tieren eingesetzt werden. Bei der Wahl eines Modells muss auch über die am besten geeignete Position des implantierten Tumors entschieden werden. Durch eine orthotope Implantation, bei der die Zellen in das Ursprungsorgan reimplantiert werden (bei HCC-Zellen in die Leber), wird die Mikroumgebung des Tumors besser wiedergegeben als bei einer ektopischen Implantation (z.B. subkutan) (Santos, Colaço and Oliveira, 2017). Subkutane Tumore sind dagegen leichter zugänglich und ihre Implantation ist mit einem kleineren Eingriff für die Tiere verbunden.

Wie in Kapitel II. 1. 1. beschrieben, stellt eine Hepatitisvirusinfektion eine der Hauptursachen für die HCC-Entstehung dar. Die in der Forschung hauptsächlich eingesetzten Kleinsäuger Maus und Ratte sind für keine ähnlich verlaufende, als Modell geeignete Hepatitisvirusinfektion empfänglich. Ein dem humanen Krankheitsprozess ähnliches Modell lässt sich allerdings in Walddarmmeltieren durch die Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) und in Kalifornischen Zieseln durch die Infektion mit dem Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) erzeugen (Kramer *et al.*, 2005).

Einzelne Wirkungsweisen einer humanen Hepatitisvirusinfektion lassen sich aber dennoch an Mäusen untersuchen, indem genetisch modifizierte Mausmodelle erzeugt werden, die beispielsweise HBV- oder HCV-Proteine exprimieren. Aber nicht nur die Expression viraler Proteine spielt bei GEM in der HCC-Forschung eine Rolle. Auch die Auswirkungen einzelner Mutationen oder das Zusammenspiel verschiedener Mutationen, die im HCC gehäuft auftreten, kann so untersucht werden. Zu nennen wären hier unter anderem Modelle mit Abweichungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, PI3K-Akt-Signalweg sowie in der Expression von c-Myc, TGF- α oder p53 (Newell *et al.*, 2008).

4. Hyperpolarisations-MRS

Bei der Hyperpolarisations-MRS handelt es sich um ein neues Bildgebungsverfahren, welches auf der in der Klinik angewandten Magnetresonanztomographie (MRT) und -spektroskopie (MRS) basiert und die Visualisierung von Stoffwechselvorgängen in

Echtzeit und mit hoher Spezifität erlaubt. Während die Magnetresonanztomographie die Morphologie darstellt, können mit der Magnetresonanzspektroskopie Metabolitenkonzentrationen in verschiedenen Geweben bestimmt werden. Man macht sich hierbei die Kernspinresonanz zunutze. In der Klinik findet bisher hauptsächlich die ^1H -MRS Anwendung, da andere Atomkerne wie ^{13}C oder ^{31}P in der klassischen MRS ein zu geringes Signal aufweisen. Diese Limitation eines zu geringen Signals kann, wie folgend dargelegt, durch die Hyperpolarisation aufgehoben werden (Prost, 2008).

4.1. Hyperpolarisation

Mit der Methode der Hyperpolarisation wurde eine Möglichkeit geschaffen, das NMR-Signal von Atomkernen stark zu erhöhen und die limitierte Sensitivität der konventionellen MRS - im Falle des ^{13}C -Kohlenstoffs aufgrund eines niedrigen gyromagnetischen Verhältnisses und geringen natürlichen Vorkommens - zu umgehen (Hu *et al.*, 2011). Diese gesteigerte NMR-Sensitivität lässt sich durch die sogenannte Polarisationssteigerung (ε) quantifizieren, welche sich durch das Verhältnis von hyperpolarisiertem Signal (S_{hyper}) zu thermischem Signal (S_{thermal}), akquiriert unter den gleichen experimentellen Bedingungen, beschreiben lässt, oder aber durch das Polarisationslevel (P_{hyper}). Dieses kann durch die Multiplikation des thermischen Polarisationslevels (P_{thermal}) mit ε berechnet werden:

$$P_{\text{hyper}} = \frac{S_{\text{hyper}}}{S_{\text{thermal}}} \cdot \tanh \frac{\gamma(X)\hbar B_0}{2k_B T} = \varepsilon \cdot P_{\text{thermal}}$$

wobei $\gamma(X)$ das gyromagnetische Verhältnis der $\text{spin-}^{1/2}$ Nuklei, \hbar die reduzierte Planck-Konstante, B_0 die Magnetfeldstärke, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur bezeichnet (Hundshammer, Düwel and Schilling, 2017).

Bei den folgenden vier Methoden handelt es sich um die wohl wichtigsten und am häufigsten genutzten Hyperpolarisations-Techniken:

Die erste Technik ist das SEOP (spin exchange optical pumping), mit welcher Edelgase polarisiert werden können. Hierbei wird in einem Alkalimetалldampf durch zirkular polarisiertes Laserlicht und Wechselwirkungen mit Stickstoffgasatomen eine Reihe von elektronischen Zustandsübergängen ausgelöst, um die Elektronenspins der Alkalimetallatome zu polarisieren. Im Anschluss übertragen die polarisierten Alkalimetallatome ihre Elektronenpolarisation durch Kollisionen auf die Edelgasatome (Appelt *et al.*, 1998).

Bei der sogenannten SABRE-SHEATH (signal amplification by reversible exchange in shield enables alignment transfer to heteronuclei) wird die Spinordnung bei niedriger Feldstärke von Parawasserstoff auf das Zielmolekül übertragen und dort in Spinpolarisation umgewandelt. Dafür ist Iridium als aktivierter Katalysator nötig. Dies schränkt die Auswahl an verwendbaren Zielmolekülen für diese Methode ein, da eine vorübergehende Bindung an den Übergangsmetallkatalysator zustande kommen muss (Adams *et al.*, 2009). Der Polarisationstransfer läuft am effektivsten bei einer geringeren Magnetfeldstärke als der der Erde ab. Deshalb wird die Reaktion durch Nickel-Eisen-Legierungen mit hoher magnetischer Permeabilität abgeschirmt (Theis *et al.*, 2015).

Im Gegensatz dazu erfolgt die Polarisation bei der PHIP (parahydrogen induced polarization) durch die chemische Bindung von Parawasserstoff an ein geeignetes, ungesättigtes Vorläufermolekül. Durch sogenanntes field cycling, bei welchem das Umgebungsmagnetfeld auf nahezu null gedrückt wird, gefolgt vom Wiederherstellen eines äußeren Magnetfeldes, kann die Polarisation von den ^1H -Kernspins auf die ^{13}C -Kernspins übertragen werden, wodurch das hyperpolarisierte Zielmolekül entsteht (Eisenschmid *et al.*, 1987; Reineri, Boi and Aime, 2015).

Bei der vierten Technik handelt es sich um die dDNP (dissolution dynamic nuclear polarization). Hierbei erreichen die Elektronen von freien stabilen Radikalen (z.B. OX063) bei einer Temperatur von rund 1,2 K, herbeigeführt durch die Kühlung mit flüssigem Helium, und einer Magnetfeldstärke von 3,35 T eine Polarisation von bis zu 95 %. Die Polarisation wird dann mit Hilfe von Mikrowellen auf den Nucleus der Zielmoleküle im festen, gefrorenen Zustand übertragen. Eine ausreichend hohe Polarisation wird normalerweise je nach Zielmolekül nach 0,5 - 2 Stunden erreicht. Die sogenannte Dissolution, also das Lösen der hyperpolarisierten Zielsubstanz, erfolgt dann mit Hilfe einer unter Druck gesetzten, pH-gepufferten und erhitzten Lösung. Zu geeigneten Zielnuklei für diese Methode gehören ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{89}Y (Ardenkjaer-Larsen *et al.*, 2003; Hundshammer, Düwel and Schilling, 2017).

Sowohl bei der präklinischen *in-vivo*-Bildgebung als auch in den vereinzelten klinischen Studien findet hauptsächlich die dDNP Anwendung. Bei der dDNP muss zwar im Gegensatz zu PHIP und SABRE teure Tieftemperaturtechnik eingesetzt werden, diese Technik ist aber flexibler, was die zu polarisierenden Zielmoleküle betrifft.

Da das hyperpolarisierte Signal aufgrund der Spin-Gitter-Relaxation (auch T_1 -Relaxation genannt) abfällt, aber für die *in-vivo*-Bildgebung nach der Dissolution eine gewisse

Zeit vergeht, bis das Hyperpolarisat zum Scanner transportiert und injiziert ist, sich über den Kreislauf verteilt und im zu untersuchenden Gewebe angereichert hat, sind eine lange T_1 -Relaxationszeit und eine möglichst hohe anfängliche Polarisierung von Bedeutung (Hundshammer, Düwel and Schilling, 2017). Für hyperpolarisiertes $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat, welches auch in den Messungen für diese Arbeit Anwendung fand, liegt die T_1 (bei $B_0 = 7\text{T}$) bei ungefähr 30 s. Somit kann *in vivo* für 2 - 3 Minuten ein hyperpolarisiertes Signal gemessen werden (Serrao and Brindle, 2016).

4.2. MRS/MRSI mit hyperpolarisiertem $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat in der Tumorbildgebung

Bisher wird bei Tumorerkrankungen das Therapieansprechen über die Feststellung einer Größenänderung des Tumors im Verlauf beurteilt. Weil diese Änderung aber erst im Lauf von Wochen sichtbar wird und deren Beurteilung sehr ungenau ist, vergeht bis zu einer sicheren Aussage über das Therapieansprechen viel Zeit. Die Hypothese ist, dass Änderungen im Tumormetabolismus, dargestellt durch die Hyperpolarisations-MRS, erheblich schneller Rückschlüsse auf den Erfolg einer Therapie zulassen und dadurch auch ein rascheres Anpassen der Behandlung im Falle eines Nichtansprechens ermöglichen (Brindle, 2008; Lodi, Woods and Ronen, 2013).

Mit verschiedenen hyperpolarisierten Molekülen können mittlerweile unterschiedliche Bereiche der Tumorbiologie untersucht werden. Beispielsweise kann mit ^{13}C -Bikarbonat der pH-Wert dargestellt werden (Gallagher *et al.*, 2008), ^{13}C -Urea dient als Perfusionsmarker (Wilson *et al.*, 2010) und $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Fumarat der Detektion von Zellnekrose (Gallagher *et al.*, 2009; Düwel *et al.*, 2016). Im Bereich des Tumormetabolismus ist Pyruvat als zentrales Stoffwechselprodukt von Interesse für die Hyperpolarisationsbildgebung. Pyruvat wird als Endprodukt der Glykolyse über die oxidative Phosphorylierung bis zu Kohlenstoffdioxid oxidiert, mittels der Alanin-Aminotransferase (ALT) zu Alanin umgewandelt oder durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat verstoffwechselt (Lu, Tan and Cai, 2015; Faubert *et al.*, 2017). Bei der in Tumorzellen exprimierten LDH handelt es sich um die Isoform A. Die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat stellt eine reversible Reaktion dar, bei der NADH bzw. NAD^+ als Cofaktor benötigt wird (siehe Abb. 6). Hyperpolarisiertes ^{13}C -Pyruvat eignet sich trotz der kurzen Halbwertszeit der Hyperpolarisation von 30 - 40 s für die Untersuchung der Laktatbildung im Tumor, da die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat ausreichend schnell vonstattengeht (Hu *et al.*, 2011; Serrao and Brindle, 2016).

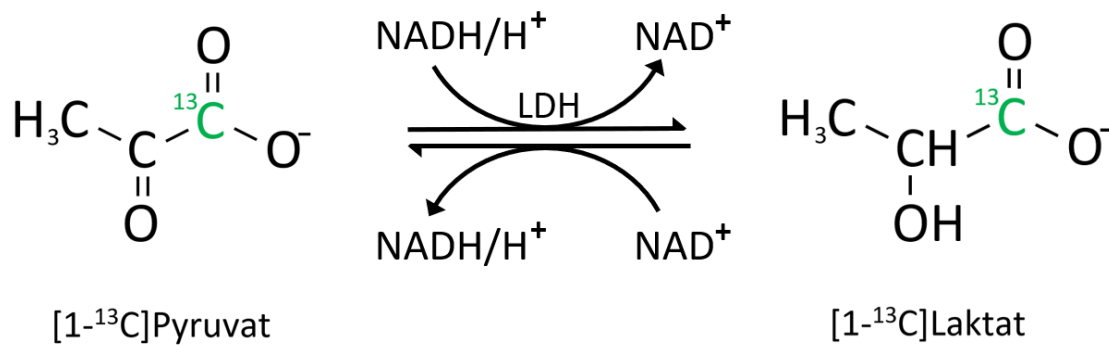


Abb. 6: Reaktionsgleichung zwischen [1-¹³C]Pyruvat und [1-¹³C]Laktat (beide Moleküle dargestellt in deprotonierter Form); LDH: Laktatdehydrogenase, NAD⁺: Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form), NADH: Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form); H⁺: Proton

Bei der spektroskopischen Magnetresonanzbildgebung von hyperpolarisiertem [1-¹³C]Pyruvat und seinem metabolischen Produkt [1-¹³C]Laktat erfolgt jedoch keine Nettokonversion zu Laktat, sondern ein LDH-katalysierter Austausch zwischen Pyruvat und Laktat. Pyruvat und Laktat befinden sich hierbei in einer Austauschreaktion, die nahe dem chemischen Gleichgewicht ohne Änderung der Gesamtkonzentrationen stattfindet, so dass effektiv nur das ¹³C-Atom zwischen Pyruvat- und Laktatpool ausgetauscht wird („label exchange“). Die gleichzeitig mit der Bildung von ¹³C-Laktat stattfindenden, LDH-katalysierten Hin- und Rückreaktionen zwischen ¹²C-Laktat und ¹²C-Pyruvat werden von der spektroskopischen Magnetresonanzbildgebung dabei nicht erfasst. Experimentell konnte dieser Austauschprozess *in vitro* durch das Hinzufügen von exogenem Laktat zu Zellsuspensionen gezeigt werden, in denen eine Zunahme der Ratenkonstante des Austausches von Pyruvat zu Laktat beobachtet wurde (Day *et al.*, 2007). Diese Zunahme steht im Einklang mit einem Austauschprozess nahe des Reaktionsgleichgewichts und im Gegensatz zu einer reinen Nettokonversion von Pyruvat zu Laktat, bei welcher eine Vergrößerung des Laktatpools aufgrund seiner produkthemmenden Wirkung zu einer Reduktion der Konversionsrate führen würde. (Brindle, 2015; Serrao *et al.*, 2018).

Die in der Klinik als Standardmethode zur metabolischen Bildgebung eingesetzte Positronenemissionstomographie (PET) mit dem radioaktiv markierten Glukose-

Analogon [^{18}F]Fluorodesoxyglukose (FDG) weist in der Präklinik eine ähnliche Sensitivität für die frühe Beurteilung des Therapieansprechens auf wie die Hyperpolarisations-MRT (Witney *et al.*, 2009). Es gibt aber Tumore, die sich für eine Untersuchung mittels PET nicht gut eignen. Hierzu gehören hepatozelluläre Karzinome, von denen ein großer Teil keine FDG-Aufnahme zeigt (Galle *et al.*, 2018), Gehirntumore, deren FDG-Aufnahme durch die generell hohe FDG-Aufnahme im Gehirn überlagert werden kann, und Prostatatumore, bei denen das geringe Tumorsignal von einem hohen Signal der Blase überdeckt werden kann (Brindle, 2008). Für diese Tumore stellt die Hyperpolarisations-MRT mit ^{13}C -Pyruvat eine vielversprechende Alternative dar.

Ein weiterer Vorteil der Hyperpolarisations-MRT besteht darin, dass diese Methode für den Patienten keine radioaktive Belastung bedeutet und deshalb auch gut für wiederholte Untersuchungen eingesetzt werden kann. Aufgrund der oben bereits erwähnten kurzen Halbwertszeit der Hyperpolarisation eignet sie sich dagegen nicht für länger dauernde Untersuchungen wie Ganzkörperscans zur Detektion von Fernmetastasen (Brindle, 2015).

Da sich zwischen der Laktatproduktion eines Tumors und dessen Proliferation und Metastasierung ein Zusammenhang herstellen lässt (siehe Kapitel II. 2. 2.), ist die bildgebende Darstellung des Laktatstoffwechsels nicht erst bei der Beurteilung des Therapieansprechens von Interesse, sondern bereits bei der Stratifikation von Krebserkrankungen und deren Vorstufen.

Serrao *et al.* konnten für das Pankreaskarzinom im Mausmodell demonstrieren, dass die metabolische Hyperpolarisationsbildgebung mit ^{13}C -Pyruvat sowohl zur Detektion von Vorläufer-Läsionen als auch zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs geeignet ist, indem sie zeigten, dass das durch die Hyperpolarisationsbildgebung ermittelte Alanin/Laktat-Verhältnis über die Entwicklung von einer Vorläufer-Läsion bis hin zum Adenokarzinom abnimmt, ebenso wie das Verhältnis der Enzymaktivitäten von ALT zu LDH, welches *ex vivo* aus Extrakten der Pankreasläsionen bestimmt wurde (Serrao *et al.*, 2016). In einer anderen Studie wiesen Hu *et al.* an einem endogenen, Myc-induzierten HCC-Modell in der Maus nach, dass im Vergleich zu gesundem Lebergewebe bei Tumorwachstum eine erhöhte Umwandlung von Pyruvat zu Laktat sowie bei Tumorregression ein Abfall der Laktatkonversion mithilfe von Hyperpolarisationstechnik dargestellt werden kann und diese mit der *ex-vivo*-Validierung korreliert (Hu *et al.*, 2011).

Auch in der Klinik wurden bereits erste Studien durchgeführt, in denen der Einsatz von Hyperpolarisationsbildgebung am Patienten getestet wurde. So untersuchten Nelson *et al.* in der ersten Studie am Menschen die Sicherheit und Durchführbarkeit der Hyperpolarisationsbildgebung mit ^{13}C -Pyruvat an Patienten mit Prostatakarzinomen. In dieser Studie konnte keine dosis-limitierende Toxizität des injizierten Hyperpolarisats nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde ein erhöhtes ^{13}C -Laktat/ ^{13}C -Pyruvat-Verhältnis in durch Biopsie bestätigten, tumorbefallenen Regionen gemessen (Nelson *et al.*, 2013). Neben aktuell laufenden klinischen Studien zur Hyperpolarisationsbildgebung mit ^{13}C -Pyruvat bei Patienten mit Prostatakarzinomen werden in anderen Studien beispielsweise Patienten mit Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs oder Gehirntumoren untersucht

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=13c+pyruvate+hyperpolarized&cntry=&state=&city=&dist=> ; abgerufen am 16.03.2019).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Studie wurde im Rahmen eines von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrages durchgeführt (Az.: 55.2-1-54-2532-25-2016).

Insgesamt wurden 2 Wistar-Ratten und 10 Nacktratten verwendet, wobei die Wistar-Ratten im Modell des Diethylnitrosamin-induzierten hepatozellulären Karzinoms der Ratte verwendet wurden und die Nacktratten für die Generierung subkutaner Tumore und deren Untersuchung in der Bildgebung.

Die Wistar-Ratten (RccHan:WIST) wurden von dem kommerziellen Züchter Envigo (Re Schaijk, Niederlande) bezogen. Bei diesen Tieren handelt es sich um einen Auszuchtstamm mit albinotischem Phänotyp. Es wurden männliche Tiere im Alter von 6 - 8 Wochen (Zeitpunkt des Studienbeginns) verwendet.

Bei den Nacktratten (CrI:NIH-Foxn1^{tmu}) handelt es sich um einen Auszuchtstamm athymischer, phasenweise haarloser Ratten. Sie stammten vom kommerziellen Züchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland).

1.1. Tiermodelle

1.1.1. Diethylnitrosamin-induziertes hepatozelluläres Karzinom der Ratte

Die DENA-Induktion erfolgte durch Envigo in den Niederlanden. Den sechs bis acht Wochen alten Ratten wurde über einen zehnwöchigen Zeitraum DENA (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) über das Trinkwasser als 0,01%ige Lösung verabreicht. Die Trinkwasserlösung wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Dann folgte eine zweiwöchige Auswaschphase, in welcher die Ratten die Chemikalie restlos aus ihrem Körper ausscheiden konnten, bevor sie in den Haltungsraum des Zentrums für Präklinische Forschung (siehe Kapitel III. 1. 2.) überführt wurden. Nach einwöchiger Eingewöhnung erfolgte zur Überwachung der Tumorentstehung eine wöchentliche MRT-Messung an einem humanen 3T-MRT-System (Philips Ingenia 3.0T; Philips Medical, Amsterdam, Niederlande).

1.1.2. Subkutane Tumorgenerierung in der Ratte

Die zu implantierenden Zellen wurden bei ca. 80%iger Füllung des Kulturgefäßes

verwendet. Nach dem Waschen der Zellen mit DPBS, dem Trypsinieren und der Inaktivierung von Trypsin mit FBS-haltigem Medium, wurden die Zellen zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen in DPBS resuspendiert. Die Zellzahl in dieser Suspension wurde anhand von mit Trypanblau (Trypan Blue Solution, 0.4 %; Gibco; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (HBG Henneberg-Sander GmbH, Giessen-Lützellinden, Deutschland) ermittelt. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen auf eine Konzentration von 10^6 pro 100 µl Medium (DMEM) verdünnt. Bis zur anschließenden Implantation in die Ratte standen die Zellen auf Eis.

Die Tumorinduktion erfolgte durch subkutane Injektion (27 G Kanüle Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) von 10^6 Zellen (suspendiert in 100 µl Medium ohne FBS) im Bereich der rechten bzw. linken Flanke unter Isoflurannarkose. Die Einleitung erfolgte in einer Ganzkörperkammer (Induction chamber rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Schweiz) mit 5 % Isofluran bei einem Sauerstoffdurchfluss von 2 l/min bis zum Verlust des Stellreflexes, die Erhaltung mit einer Kopfkammer bei 1,5 - 2,5%iger Isoflurankonzentration und ebenfalls 2 l/min Sauerstoffdurchfluss. Zum Schutz der Cornea vor Austrocknung wurde eine Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) appliziert. Das Wachstum der subkutanen Tumore wurde mittels Palpation und Vermessung kontrolliert (Untersuchungsintervall siehe Kapitel III. 1. 2.). Ab Erreichen eines Tumordurchmessers von rund 1,0 cm wurden die Tiere für die Studie verwendet.

Das Tumolvolumen wurde mit der Formel $L \times W^2 \times 0,5$ berechnet, wobei L der längste und W der kürzeste Durchmesser des Tumors ist (Daemen *et al.*, 2015; Iansante *et al.*, 2015). Die Tumore wurden dazu am Tag der Tumorentnahme vermessen.

1.2. Versuchstierhaltung

Die Haltung erfolgte in Umsetzung der EU-Richtlinie 2010/63.

Der Tierhaltungsraum unterliegt einer personenlimitierten Zutrittskontrolle. Es herrscht ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphasen, eine Luftfeuchte von 45 - 60 % und die Temperatur beträgt 20 - 22°C. Neben der Betreuung der Tiere durch die versuchsdurchführenden Personen erfolgt eine tägliche Kontrolle durch ausgebildetes Pflegepersonal. Während der gesamten Studie wurden die Tiere von der

versuchsdurchführenden Person einmal wöchentlich nach im Tierversuchsantrag festgelegten Kriterien (siehe Abb. 7) beurteilt und bei Auffälligkeiten täglich kontrolliert oder bei Erreichen der im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien unter Isoflurannarkose mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

Versuchsleiter								Blatt 1
Stellvertreter								
Tierschutzbeauftragter								
TVA Nummer								
Herkunft der Tiere								
Spezies								
Geschlecht								
Alter bei Ankunft								
Haltungsraum								
	Datum							
	Woche	1	2	3	4	5	6	
	Tag	0	7	14	21	28	35	
Standardgewicht								
Tiernummer								
	1							
	2							
	3							
	4							

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: right;">Versuchsleiter</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">Stellvertreter</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">Tierschutzbeauftragter</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">TVA Nummer</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">Scoringdatum</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">Tag der Studie</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: right;">Datum der Tumorimplantation; Zelllinie</td><td></td></tr> </table>	Versuchsleiter		Stellvertreter		Tierschutzbeauftragter		TVA Nummer		Scoringdatum		Tag der Studie		Datum der Tumorimplantation; Zelllinie		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2" style="text-align: center;">Verantwortlich für das Scoring</td></tr> <tr><td style="width: 50%;">Name</td><td></td></tr> <tr><td>Name</td><td></td></tr> <tr><td colspan="2" style="height: 20px;"></td></tr> </table>	Verantwortlich für das Scoring		Name		Name			
Versuchsleiter																							
Stellvertreter																							
Tierschutzbeauftragter																							
TVA Nummer																							
Scoringdatum																							
Tag der Studie																							
Datum der Tumorimplantation; Zelllinie																							
Verantwortlich für das Scoring																							
Name																							
Name																							

Blatt 2

Scoringtabelle	Punkte	Tiernummer				Kommentare
		1	2	3	4	
I Veränderungen im Körpergewicht						
Keine oder Zunahme	0					
< 5% Verlust	1					
5 - 10% Verlust	5					
11 - 20% Verlust	10					
> 20% Verlust	20					
(zum Ausgangsgewicht)						
II Allgemeine Veränderungen						
Normales Fell, Normale Körperöffnungen	0					
Verminderte Selbstpflege	1					
Verschmutztes Fell oder Körperöffnungen, Erhöhter Tonus	5					
Verschmutzte Haut, verklebte Körperöffnungen, abnorme Haltung, hoher Muskeltonus	10					
Krämpfe, Lähmungserscheinungen, Körpertemperaturabfall	20					
Zwischenscore						
Score von letzter Inspektion						
III Verhalten						
Normal	0					
Geringe Veränderungen	1					
Abnormes Verhalten*	5					
Hyperkinese bei sonst typischem Verhalten, palpabler Tumor >1,5 cm	10					
Autoaggression, Hyperkinese bei abnormem Verhalten*, Sichtbarer Tumor oder palpabler Tumor > 3cm	20					
IV OP-Wunde						
Reizlos, Sauber	0					
Nahtdehiszenz, Wundinfektion, Kratzen	10					
Eröffnung des OP-Situs	20					
V subkutaner Tumor						
Tumorschmerzen	10					
Ulceration mit Exsudation	20					
Durchmesser >3 cm	20					
Gesamtscore						

Abb. 7: Beispiel eines Score Sheets zur Beurteilung der Tiere während des Versuchs (Blatt 1: Gewichtsentwicklung, Blatt 2: Allgemeinzustand)

Für die Haltung der Ratten wurden einzelbelüftete Käfige (Sealsafe Next Blueline IVC-Käfige Typ III H; Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) verwendet. Die Besatzdichte richtete sich nach dem Gewicht der Tiere. Jeder Käfig enthielt Holzgranulat als Einstreu (Select fine; Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), das zweimal pro Woche gewechselt wurde. Des Weiteren wurde autoklavierter Zellstoff als Nistmaterial und eine Kriechröhre aus rotem Polycarbonat (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Ratten erhielten autoklaviertes Futter (Haltungsfutter No. 1324SP Ratte/Maus, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) *ad libitum*. Das angesäuerte Trinkwasser (1N HCl, pH 3,5 - 3,0) stand ebenfalls *ad libitum* zur Verfügung und wurde einmal wöchentlich, im Bedarfsfall öfter, gewechselt.

Nach dem Transport der Tiere schloss sich eine einwöchige Eingewöhnungsphase an, in der sie keinen belastenden Maßnahmen unterzogen wurden. Erst nach Ende dieser Zeit wurden sie in den Versuch aufgenommen.

2. Zellisolierung

Zur Zellisolierung wurden Tumore ab einer Größe von 5 mm verwendet. Die Tumore wurden nach Euthanasie der Ratten entnommen und in dem später auch für die Zellkultivierung verwendeten HCC-Zellmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel III. 3.) zerkleinert, die Suspension anschließend bei 37°C 30 min mit Liberase TM (20 µg/ml; Hoffmann - La Roche, Basel, Schweiz) inkubiert, durch einen 100-µm-Zellfilter (BD Bioscience, Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA) gefiltert und bei 500 g 5 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellpellets in 20 ml frischem Medium wurden die Zellen in 20 ml Medium ausplattiert (15-cm-Platte). Bis zur Konfluenz der Zellen wurde das Medium alle drei bis vier Tage erneuert. Um einzelne Klone zu isolieren, wurden die Zellen dann 1:100 gesplittet und nach Sichtbarwerden einzelner Klone wurden diese mit in Trypsin getränktem Filterpapier abgelöst und zur Expansion in 24-Well-Platten transferiert.

3. Zellkultur

Bei allen Zelllinien handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen, die in hoch glukosehaltigem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin (DMEM high glucose; Biowest, Nuaille, Frankreich) kultiviert wurden. Dem Medium wurden außerdem 10 % FBS (FBS Superior; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 1 % Natrium-Pyruvat (100 mM; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 1 % nicht essentielle Aminosäuren (HyClone AdvanceSTEM ES Qualified Amino Acids; GE Healthcare, Chicago, USA) und 1 % Penicillin-Streptomycin (PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Um die Vergleichbarkeit der Zelllinien untereinander für die Charakterisierung zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die Klone sich bei den verschiedenen Untersuchungen jeweils im gleichen Wachstumsstadium befanden.

Reagenzien/Materialien/Geräte	Firma
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS	PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland
75-cm ² -Zellkulturflaschen	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
150-cm ² -Zellkulturplatten	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
100 - 1000 µl Pipette, Research plus	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
20 - 200 µl Pipette, Research plus	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
2 - 20 µl Pipette, Research plus	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
0,5 - 10 µl Pipette, Research plus	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
Tip One RPT, Pipettenspitze 10 µl RNase-, DNase-, DNA- und Pyrogen-frei	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
RPT Filterpipettenspitzen, 20 µl	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
Universal Fit Pipet Tips, 200 µl	Corning Inc., Corning, USA
ClearLine Filterpipettenspitzen, 1000 µl	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Stripettor Ultra pipet controller	Corning Inc., Corning, USA

Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 2 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikroskop: OPTECH Optical Technology	Exacta+Optech GmbH, München, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HERAsafe, Scientific Biological Safety Cabinet	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
HERAcell Heraeus, CO ₂ -Incubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reax top Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle 1: Für Zellkultur und Zellversuche verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte, die in den einzelnen Kapiteln nicht explizit aufgeführt sind

3.1. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für eine sichere Lagerung und Konservierung von Zellen gleicher Passagenummer wurden diese eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen und Trypsinieren zentrifugiert (5 min, 500 g) und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen in sogenanntem Freezing-Medium, bestehend aus dem normalen Kulturmedium der Zellen und 10 % Dimethylsulfoxid (ROTIPURAN $\geq 99,8$ %, p.a. DMSO; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert, je ein Milliliter der Suspension in Kryoröhrchen (Thermo Scientific 347597; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gefüllt und in einer speziellen Box zum langsamen Einfrieren von Zellen (Mr. Frosty Gefrierbehälter,

Thermo Scientific; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in den Flüssigstickstoff-Tank umgelagert.

Zum Auftauen wurden die Zell-Aliquots bei 37°C im Wasserbad erwärmt und die aufgetaute Suspension in einem Zentrifugenröhrchen vorsichtig mit 2 - 3 ml Kulturmedium vermischt. Dann wurde die Lösung mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert (5 min, 500 g), der Überstand abgesaugt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde in 75-cm²-Kulturflaschen gegeben und in den Brutschrank gestellt, um die Zellen zu kultivieren.

3.2. Bestimmung der Verdopplungszeiten

Zur Ermittlung der Verdopplungszeiten wurden die Startzellzahl sowie die finale Zellzahl nach 48 und 72 Stunden Inkubationszeit bestimmt. Sowohl initial vor dem Aussäen als auch nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dazu nach dem Waschen mit DPBS trypsinisiert und das Trypsin mit dem Kulturmedium der Zellen inaktiviert. Die Zellzahl in dieser Suspension wurde anhand von mit Trypanblau (Trypan Blue Solution, 0.4%; Gibco; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (HBG Henneberg-Sander GmbH, Giessen-Lützellinden, Deutschland) ermittelt.

Diese Größen wurden dann in die Formel (Roth V., 2006)

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{\text{Inkubationszeit} * \log 2}{\log(\text{Endkonzentration}) - \log(\text{Anfangskonzentration})}$$

eingesetzt, um die Verdopplungszeiten zu berechnen.

3.3. Immunhistochemie zur Charakterisierung der Zellen als HCC-Klone

Das nachfolgende Vorgehen wurde für jede Zelllinie einzeln durchgeführt.

Nach dem Waschen mit DPBS, Trypsinieren und Inaktivieren des Trypsins durch Kulturmedium wurden die Zellen zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min), danach der Überstand abgesaugt und die Zellen zur Fixierung in 200 µl Paraformaldehyd (PFA) 4%ig (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde die Suspension zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min) der PFA-Überstand abpipettiert und die Zellen zweimal aufeinanderfolgend in 500 µl PBS resuspendiert, zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min), sowie der Überstand abpipettiert.

Danach wurden die Zellen unter Vermeidung von Blasenbildung in 200 µl Agarose 1%ig, 37°C warm (LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) resuspendiert und bis zum Festwerden der Masse bei 4°C gelagert.

Anschließend folgten Entwässerung, Einbettung und Schneiden der Agarose-Zellpellets, wie in Kapitel III. 7. 2. beschrieben, sowie die immunhistochemische Färbung auf Zytokeratin 7 (CK7) und Hepatocyte Paraffin 1 (HepPar1), wie unter Kapitel III. 7. 2. 2. beschrieben.

3.4. Auswertung der Immunhistochemie zur Charakterisierung als HCC-Klone

Die fertigen Schnitte wurden unter dem Mikroskop betrachtet und nach ihrer Anfärbbarkeit beurteilt. Als HCC-Klone wurden diejenigen Klone eingestuft, die eine HepPar1-positive Färbung zeigten und gleichzeitig CK7-negativ waren.

3.5. LDH-Aktivitätsbestimmung *in vitro*

Um die Enzymaktivität der Zellen zu bestimmen, wurden diese zuerst mit DPBS gewaschen, trypsinisiert und das Trypsin durch Kulturmedium inaktiviert. Dann wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die in der Suspension gelöste Zellzahl bestimmt und eine Million Zellen abpipettiert. Diese wurden zentrifugiert (4°C, 500 g, 5 min), der Überstand abgenommen, die Zellen in 200 µl Kulturmedium und 200 µl RIPA-Lysepuffer (eigene Herstellung) resuspendiert, eine Minute gut durchmischt und danach erneut zentrifugiert (4°C, 5000 rpm, 15 min). Davon wurden 200 µl Überstand abpipettiert, welche dann zur Enzymaktivitätsbestimmung mittels photometrischer Bestimmung (cobas c 701/702 System, Roche/Hitachi; LDH-Aktivitätsbestimmung: LDHI2 (Lactate Dehydrogenase acc. to IFCC ver.2) der Firma Hoffmann - La Roche, Basel, Schweiz) im Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar verwendet wurden.

3.6. „Seahorse“-Analyse

Die Analyse der Glykolyserate der lebenden Zellen erfolgte extern an einem Seahorse XFe96 Analyzer der Firma Agilent (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) und dem zugehörigen Kit (Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) in der Abteilung für Translationale Onkologie Solider Tumore

des Universitätsklinikums Essen. Mit diesem Test kann die extrazelluläre Ansäuerungsrate, welche einen wichtigen Anhaltspunkt für die glykolytische Aktivität und daraus resultierende Laktatproduktion darstellt, in Echtzeit bestimmt werden. Die Messung wurde mit 10 000 Zellen pro Well, kultiviert in deren Kulturmedium (siehe Kapitel III. 3.), in einer 96-Well-Platte entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt und ausgewertet (*Seahorse XFe96 Analyzer* | *Agilent*; abgerufen am 19.03.2019).

4. Bildgebung

4.1. Vorbereitung der Tiere

Die Ratten wurden mit Isofluran anästhesiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte wie für die subkutane Tumorinduktion in einer Ganzkörperkammer (Induction chamber rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Schweiz) mit 5% Isofluran bei einem Sauerstoffdurchfluss von 2 l/min bis zum Verlust des Stellreflexes, die Erhaltung mit einer Kopfkammer bei 1,5 - 2,5%iger Isoflurankonzentration und ebenfalls 2 l/min Sauerstoffdurchfluss. Im Zuge der Umlagerung von Ganzkörper- zu Kopfkammer wurde die Ratte gewogen und zum Schutz vor Austrocknung eine Augensalbe auf die Cornea appliziert (Bepanthen Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). In die Schwanzvene der Ratten wurde für die Dauer der Bildgebung ein Venenkatheter (BD Neoflon i.v. Venenverweilkanüle, Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA) eingebracht, mit Klebeband fixiert (Durapore; 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) und an einen mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Verlängerungsschlauch (120 cm Microbore Extension Set; Smith Medical, St. Paul, USA) angeschlossen, über welchen während der Bildgebung das Hyperpolarisat verabreicht wurde. Die Körpertemperatur der Tiere wurde überwacht und während der gesamten Vorbereitung durch Lagerung der Ratten auf einer Wärmematte (16-Watt-Wärmematte; TRIXIE Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Trap, Deutschland) stabil gehalten. Nach Ende der Vorbereitung wurden die Ratten unter Narkose in den 7T-Kleintier-MRT verbracht.

4.2. Bildgebungssequenzen

Bei dem MRT-Gerät handelt es sich um einen Kleintier-Magnetresonanztomographen

in der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar mit einem 7T MR901 Magneten (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), der mit einer Bruker AVANCE III HD Elektronik (Bruker Corporation, Billerica, USA) arbeitet (siehe Abb. 8a). Nach Platzierung der Tiere im MRT wurden die ^{13}C -Oberflächenspulen (^{13}C Miniflex 20 mm, single-channel; RAPID Biomedical GmbH, Würzburg-Rimpar, Deutschland; siehe Abb. 8b) für die Spektroskopiemessung jeweils zentral auf dem rechten bzw. linken Tumor fixiert. Zur genauen Lokalisation der Tumore wurden coronale und axiale ^1H -Bilder mit einer anatomischen, T2-gewichteten Sequenz akquiriert. (Coronal: Field of view 128 x 72 mm; Repetitionszeit (TR) 3000 ms; Echozeit (TE) 20 ms; Schichtdicke 1 mm; data matrix 256 x 144; Schichtanzahl 36. Axial: Field of view 72 x 54 mm; Repetitionszeit (TR) 4 s; Echozeit (TE) 48 ms; Schichtdicke 2 mm; data matrix 240 x 180; Schichtanzahl 35).

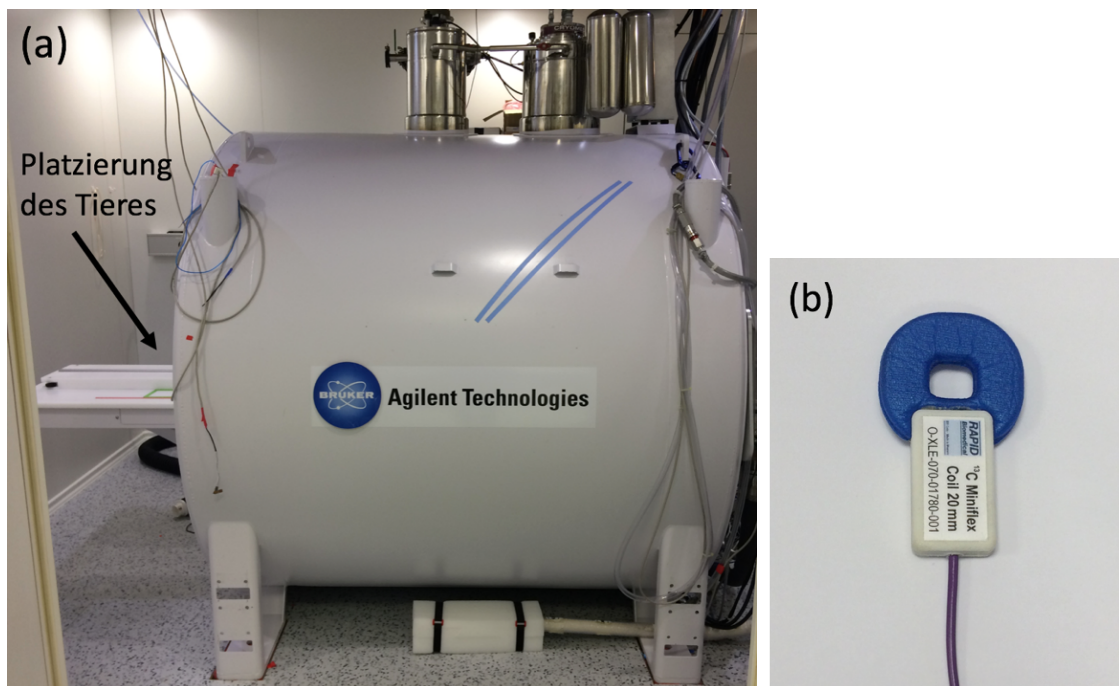


Abb. 8: (a) Kleintier-Magnetresonanztomograph in der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar mit einem 7T MR901 Magneten (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) und Bruker AVANCE III HD Elektronik (Bruker Corporation, Billerica, USA); (b) ^{13}C -Oberflächenspulen (^{13}C Miniflex 20mm, single-channel; RAPID Biomedical GmbH, Würzburg-Rimpar, Deutschland)

Basierend auf diesen anatomischen Bildern wurden die selektiven, longitudinalen Schichten zum Erfassen der Spektren der Tumore in der Hyperpolarisationsbildgebung gewählt, wobei die Schichten im sensitiven Bereich der Oberflächenspulen möglichst nur die Tumore beinhalten sollten (siehe Abb. 9).

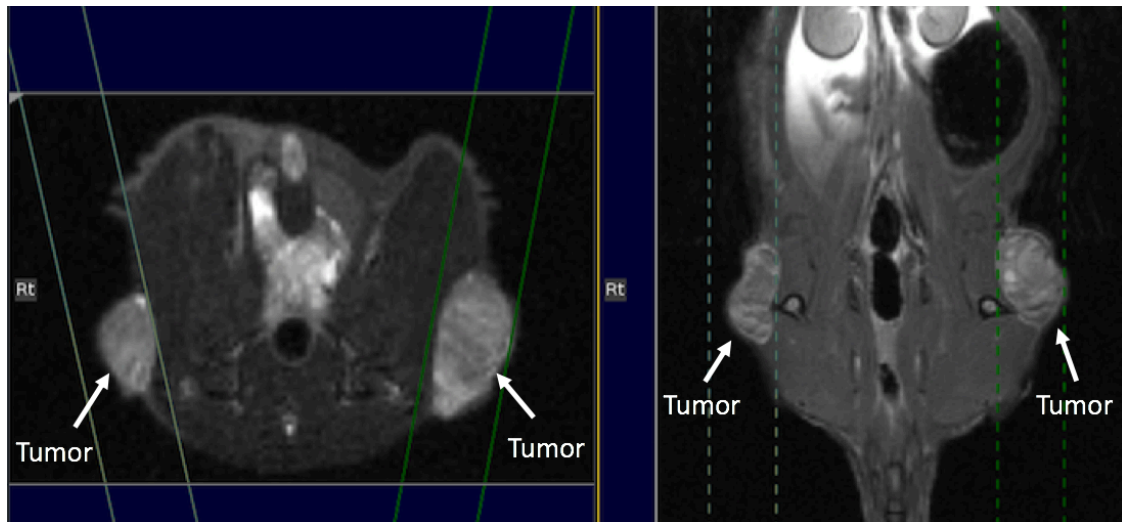


Abb. 9: Darstellung der selektiven Schichten (hell- bzw. dunkelgrün) zur Erfassung der Tumorspektren bei der Hyperpolarisationsbildgebung, basierend auf den zuvor generierten anatomischen Bildern (links axiale und rechts coronale Schichtführung)

Die dynamischen Spektroskopiedaten wurden anhand von je einer 10 mm dicken Schicht durch jeden Tumor gemessen. Die Spektren wurden alle 2 Sekunden (TR 2 s) bei einer zentralen Frequenz von 175 ppm durch eine schichtselektive Spektroskopiesequenz mit einem Flipwinkel (FA) von 5° , einer Echozeit TE von 1,032 ms, einer Bandweite von 2000 Hz und 512 Messpunkten (Erzeugung des dazugehörigen Spektrums mittels Fouriertransformation) erfasst. Die Datenakquisition startete mit Beginn der Dissolution, also 20 s vor Start der Injektion des hyperpolarisierten $[1-^{13}\text{C}]\text{Pyruvats}$ mit einer Gesamtzeit von $21,4 \pm 1,9$ s vom Start der Dissolution bis zum Ende der Injektion, und dauerte 180 s bis insgesamt 90 Spektren erfasst waren. Zur Datenanalyse wurde eine benutzerdefinierte, in Matlab geschriebene Spektroskopiedatenrekonstruktions- und -prozessierungssoftware verwendet (siehe Abb. 10 und 11).

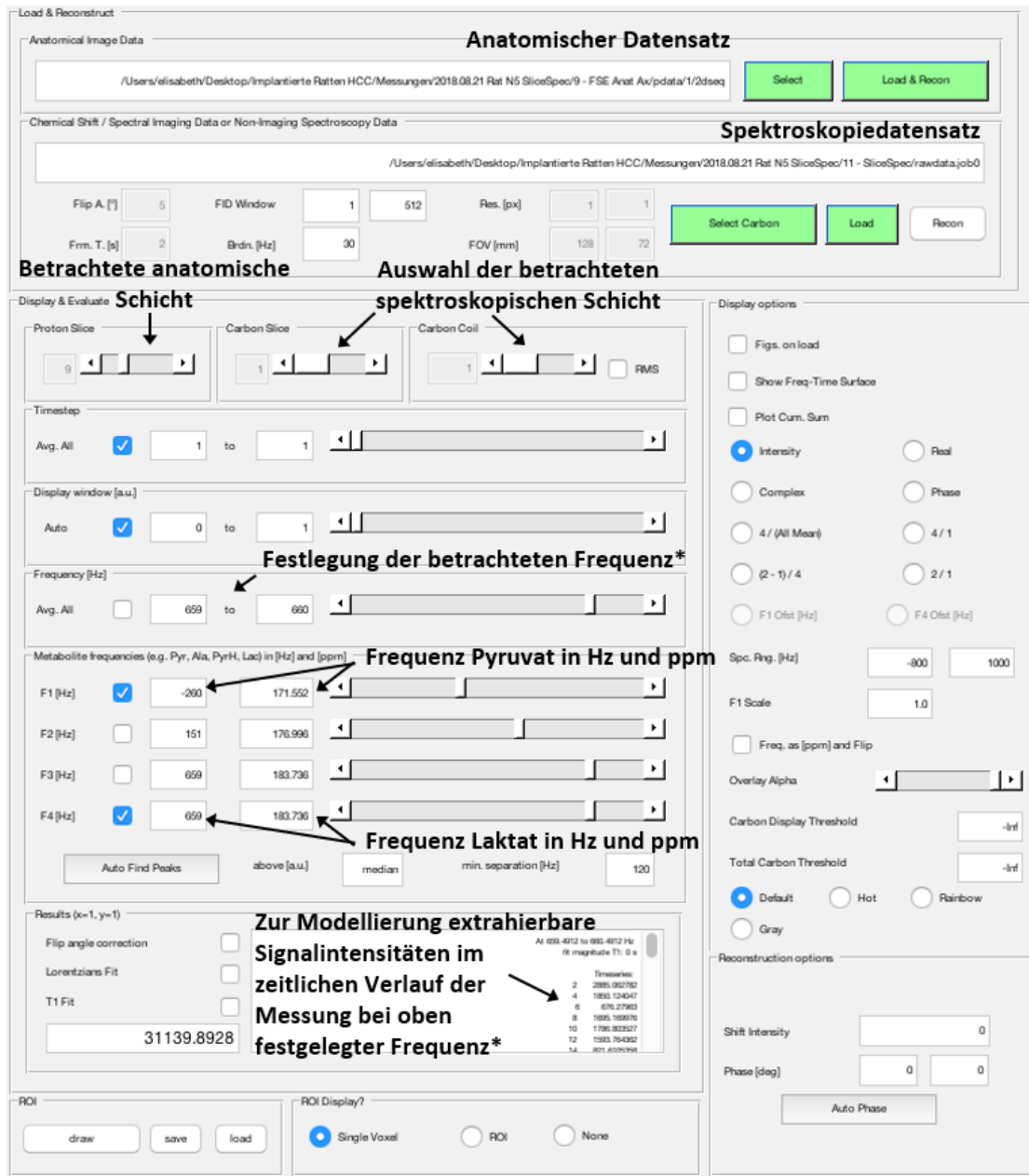


Abb. 10: Benutzeroberfläche der Spektroskopiedatenrekonstruktions- und -prozessierungssoftware mit Beschriftung der wichtigsten Bedienfelder für diese Studie

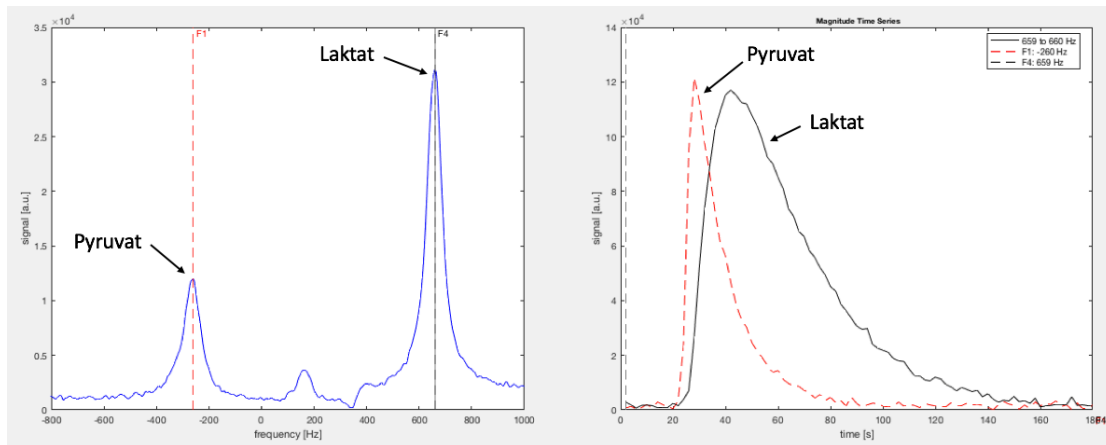


Abb. 11: Beispiel für erhaltene Spektren nach Einspeisen der Rohdaten in die Prozessierungssoftware; links gemittelt über die gesamte Messzeit, rechts im zeitlichen Verlauf

Die Körpertemperatur der Tiere wurde mit warmer Luft (Mistral-Air Plus, The37°Company, Amersfoort, Niederlande) konstant im physiologischen Bereich (36,5 - 37,9°C) gehalten. Atmung und Temperatur der Tiere wurden während der gesamten Messung mit einem drucksensitiven Atemkissen und einer Rektalsonde überwacht (SA Instruments Inc., New York, USA). Das Atemkissen wurde unter der Ratte platziert, um die Atembewegungen, d. h. die Atemfrequenz der Tiere zu messen. Aufgrund der kurzen Dauer der Bildgebung wurde die Spontanatmung als suffizient erachtet und auf eine endotracheale Intubation und kontrollierte Beatmung der Tiere verzichtet. Die Atemtätigkeit der Tiere wurde durch die kontinuierliche Anpassung der Isoflurankonzentration im inspiratorischen Isofluran-Sauerstoffgemisch reguliert. Durch das sehr starke 7T Magnetfeld können im MRT-Raum nur dafür zugelassene Spezialüberwachungsgeräte eingesetzt werden. Aufgrund dieser Gegebenheit erfolgte während der Bildgebung keine zusätzliche Atem- und Kreislaufüberwachung mittels Pulsoximetrie oder Kapnographie. Es traten während der gesamten Studie keine Narkosezwischenfälle auf. Direkt nach Ende der Bildgebung wurden die Tiere, in Narkose verbleibend, aus dem MRT genommen und vor der Tumorentnahme mittels einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

5. Hyperpolarisation

Die Hyperpolarisation erfolgte an einem HyperSense DNP Polarizer (Oxford Instruments, Abingdon, UK) in der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar (siehe Abb. 12). Für die Hyperpolarisation wurden 30 mg Pyruvatgemisch aus 14 M $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 16 mM OX063 (Oxford Instruments, Abingdon, UK) und 1 mM Dotarem (Guerbet Laboratories Ltd., Villepinte, Frankreich) in ein Standard-Probengefäß für dDNP gegeben und in den Kryostaten eingebracht. Nach der Polarisation des Pyruvats mit Mikrowellen (94,172 GHz) bis zum Erreichen des geforderten Sättigungspolarisationslevels von mindestens 90 % wurde das polarisierte Substrat durch eine unter Druck erhitzte Pufferlösung, bestehend aus destilliertem Wasser, 80 mM TRIS (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 0,1 g/l EDTA (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 80 mM $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ -Überschuss nach Justierung auf pH $\sim 7,4$, gelöst und mit Heliumspülgas aus dem Kryostaten extrahiert. Anschließend wurde der Ratte das 80 mM $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat-Polarisat (3,75 ml/kg) mit einem pH-Wert im physiologischen Bereich über einen Schwanzvenenkatheter appliziert. Das mittlere Polarisationslevel bei den gegebenen Versuchsbedingungen betrug ungefähr 38 % (Hundshammer, Düwel, *et al.*, 2018).



Abb. 12: HyperSense DNP Polarizer (Oxford Instruments, Abingdon, UK)

6. Auswertung der ^{13}C -MRS

Ratenkonstantenbasiertes Modell zur Modellierung der Pyruvat-Laktat-Konversion

Die Auswertemethode beruht im Kern auf einer von Hundshammer *et al.* publizierten Auswertung (Hundshammer, Braeuer, *et al.*, 2018). Grundlage ist ein Zwei-Seiten-Austausch-Modell, mit welchem die longitudinale Magnetisierung von Laktat, das aus Pyruvat gebildet wird, durch ein System aus gekoppelten linearen Differentialgleichungen beschrieben werden kann:

$$\frac{dM_{lac}(t)}{dt} = +k_{pl} \cdot M_{pyr}(t) - k_{lp} \cdot M_{lac}(t) - \rho_{lac} (M_{lac}(t) - \lim_{t \rightarrow \infty} M_{lac}(t)) \quad (1)$$

$$\frac{dM_{pyr}(t)}{dt} = -k_{pl} \cdot M_{pyr}(t) + k_{lp} \cdot M_{lac}(t) - \rho_{pyr} (M_{pyr}(t) - \lim_{t \rightarrow \infty} M_{pyr}(t)) \quad (2)$$

Hierbei stellen $M_{lac}(t)$ und $M_{pyr}(t)$ die longitudinalen Magnetisierungen von Laktat und Pyruvat dar, k_{pl} und k_{lp} die Ratenkonstanten für die Pyruvat-Laktat-Konversion und die entsprechende Umkehrreaktion und ρ_{pyr} und ρ_{lac} die effektiven Zerfallsraten des Pyruvat- und Laktatsignals, welche den Zerfall aufgrund von T_1 -Relaxation und Radiofrequenz(RF)-Anregung sowie Abfließen der Metaboliten aus dem sensitiven Volumen beinhalten.

Vernachlässigt man nun die thermischen Signale (entspricht $\lim_{t \rightarrow \infty} M_{lac/pyr}(t)$), können die Einflüsse von Rückkonversion von Laktat zu Pyruvat, RF-Anregung und T_1 -Relaxation zur effektiven Relaxationsrate $R_{pyr,eff}$ bzw. $R_{lac,eff}$ zusammengefasst werden. Die somit vereinfachte Gleichung 2 hat folgende Lösung, mit welcher die Pyruvatkurve modelliert werden kann:

$$M_{pyr}(t) = M_{pyr,max} \cdot e^{-R_{pyr,eff} \cdot t} \quad (3)$$

$M_{pyr,max}$ stellt dabei das maximale Pyruvatsignal dar.

Im Rahmen der Modellierung des originalen Laktatsignals wurde vorab festgestellt, dass das sich im Tumor anreichernde Laktat nicht ausschließlich aus metabolischer Konversion entstehen kann, da hierfür das Pyruvatsignal nicht schnell genug zerfällt und infolge dessen negative T_1 -Werte für Pyruvat modelliert wurden.

Deshalb wurde hier angenommen, dass nicht das gesamte Laktat im Tumor produziert wird, sondern auch Laktat aus anderen Organen über das Blut in den Tumor eingespült wird und so zum Gesamtsignal von Laktat beiträgt, was durch einen im Bereich von 0 bis 1 liegenden Skalierungsfaktor (SF), der den Anteil des im Tumor gebildeten Laktats quantifiziert, ausgedrückt wird,

$$M_{lacSF}(t) = SF \cdot M_{lac}(t) \quad (4)$$

wobei $M_{lacSF}(t)$ das Laktatsignal von tumoreigenem Laktat darstellt, SF den Skalierungsfaktor und $M_{lac}(t)$ das gesamte gemessene Laktatsignal. Hierbei stellt SF einen freien Parameter dar, der im weiteren Modellierungsverlauf vorgegeben und in Schritten von 0,05 in einem Bereich von 0 bis 1 variiert wurde. Im Anschluss an die Skalierung der Laktatkurve wurde ein k_{pl} -Wert, basierend auf der folgenden Gleichung 5, errechnet:

$$\frac{dM_{lac}}{dt} = k_{pl} \cdot M_{pyr}(t) - R_{lac,eff} \cdot M_{lac}(t) \quad (5)$$

Zur effizienten Modellierung der Datensätze wurde die Gleichung diskretisiert und

konnte somit als Matrixgleichung reformuliert werden. Durch anschließendes Invertieren der Signalmatrix (welche das Pyruvat- und Laktatsignal enthält) mittels der Moore-Penrose Pseudoinversen und Auflösen der Gleichung erhielt man den Koeffizientenvektor und somit k_{pl} und $R_{lac,eff}$.

Der ermittelte k_{pl} -Wert und der infolge dessen errechnete T_1 -Wert für Pyruvat variierten stark, wobei man aus den Modellierungsparametern $R_{pyr,eff}$ und k_{pl} direkt auf die Zerfallsrate des Pyruvats ρ_{pyr} zurückrechnen kann:

$$\rho_{pyr} = R_{pyr,eff} - k_{pl} \quad (6)$$

Anschließend war eine Flipwinkelkorrektur notwendig, um die iterative Signalzerstörung durch den Anregungspuls herauszurechnen. Diese Korrektur ist bestimmt durch TR und den Flipwinkel FA und gegeben durch Gleichung 7:

$$\frac{1}{T_{1pyr}} = \frac{1}{T_{1pyr}^*} + \frac{\ln(\cos(FA))}{TR} \quad (7)$$

wobei T_{1pyr}^* den noch nicht flipwinkelkorrigierten T_1 -Wert von Pyruvat darstellt. Damit erhielt man schlussendlich den intrinsischen T_1 -Wert für Pyruvat *in vivo* bei 7T. Für die Bestimmung eines geeigneten Wertes für SF wurde nun im Anschluss ein T_1 für Pyruvat von 30 s (Larson *et al.*, 2018) als Qualitätsmerkmal festgelegt.

Zur Beurteilung der modellierten Daten wurde ein Residuum von 0,7 als Grenzwert gesetzt. Zusätzlich wurde auf subjektiver Basis die Modellierungsqualität im signalreichen Bereich der Kurve beurteilt und unter Abschätzung beider Kriterien die Modellierung für positiv oder negativ befunden.

7. ***Ex-vivo*-Gewebeaufarbeitung der subkutanen Tumore**

Direkt nach Ende der Bildgebung wurden die Tiere, in Narkose verbleibend, aus dem MRT genommen und mittels einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Daraufhin wurde die Haut der Tiere eröffnet und die Tumore wurden schnellstmöglich entnommen. Diese wurden anschließend in drei Teile geteilt, wovon jeder für eine andere Analysemethode verwendet wurde. Die Stücke wurden so gewählt, dass sie möglichst repräsentativ für die gesamte makroskopisch erkennbare Tumormorphologie waren. Ein Teil wurde zur Gewebefixierung für die histologische Aufarbeitung in PFA 4 % gelegt. Ein zweiter Teil mit den

Abmessungen 4 x 4 x 2 mm wurde umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren, um ihn für die qRT-PCR zu konservieren. Der übrige Tumor wurde ebenfalls sofort nach Entnahme und Entfernung der oben genannten Stücke in flüssigem Stickstoff gefroren und danach bis zur weiteren Verwendung (z.B. für die Enzymaktivitätsbestimmung) bei -80°C gelagert.

7.1. Enzymaktivitätsbestimmung von LDH im Tumor

Es wurden gefrorene Gewebestücke zwischen 90,0 und 110,0 mg verwendet und das exakte Gewicht (auf 0,1 mg genau) notiert. Nach Homogenisierung der einzelnen Tumorstücke in 1 ml RIPA-Puffer (eigene Herstellung) mit einem Gewebe-Homogenisator (FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer, MP Biomedicals, Santa Ana, USA) wurden die Proben zentrifugiert (4°C, 5000 rpm, 20 min), 500 µl Überstand der wässrigen Phase abpipettiert, dieser nochmal zentrifugiert (4°C, 5000 rpm, 5 min) und hiervon 200 µl Überstand (wässrige Phase) abpipettiert und für die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität verwendet.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit unter Kapitel III. 3. 5. beschriebenen Materialien im Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar.

Mithilfe der genauen, ursprünglich eingesetzten Gewebemenge wurde die gemessene Enzymaktivität von U/l auf U/g Ursprungsgewebe umgerechnet, um die Proben direkt untereinander vergleichen zu können.

Die Proben wurden die gesamte Prozedur über bei Temperaturen bis maximal 4°C gehalten.

7.2. Histologie

Nach 24 - 48-stündiger Gewebefixierung (je nach Größe der Probe) in PFA 4% wurden die Proben über ein automatisch ablaufendes Programm mittels aufsteigender Alkohol-/Xylolreihe entwässert (Entwässerungsmaschine Leica ASP300 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München). Dann folgte die manuelle Einbettung in Paraffin (70°C, beheizbare Paraffinausgießstation mit Mikroprozessorsteuerung Leica EG1150 H; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Nach dem Aushärten konnten die Blöcke geschnitten (Mikrotom, CM 350E, Thermo Scientific; TermoFisher

Scientific, Waltham, USA), auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) aufgezogen und mit einer absteigenden Xylol-/Alkoholreihe deparaffinisiert werden. Die Schnitte wurden nachfolgend in Aqua dest. verbracht und nach unterschiedlichen Protokollen weiter behandelt.

Folgende Schnitte wurden angefertigt:

Leerschnitt		Schnittdicke [μm]	Färbung
Agarose-Zellpellet	Tumor		
1		1 - 2	IHC HepPar1
2		1 - 2	IHC CK7
	1	1 - 2	HE
	2	1 - 2	IHC CD31

Tabelle 2: Übersicht über die konsekutiv angefertigten Schnitte und deren Verwendung

Anschließend an die Färbeschritte bei der HE-Färbung bzw. an die immunhistochemischen Protokolle wurden die Schnitte entwässert und mit Pertex (Medit Mounting Medium, Mediate Cancer Diagnostics, Orlando, USA) manuell eingedeckt. Nach Abschluss aller Färbungen wurden die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt und digitalisiert (40-fache Vergrößerung, svs-Datei, automatischer Scanner für Mikroskop-Objektträger Aperio AT2 der Firma Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland).

7.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll (siehe Tabelle 3) am ersten Leerschnitt:

Färbeschritt	Verwendete Substanz	Zeit
1	Aqua dest.	25 s
2	HTX-Mayer	8 min
3	Fließendes Leitungswasser	10 min
4	Eosin alkoholisch 1 %	4 min
5	Alkohol 96 %	30 s

6	Alkohol 100 %	25 s
7	Alkohol 100 %	25 s
8	Xylol	1,5 min
9	Xylol	1,5 min

Tabelle 3: Abfolge der einzelnen Schritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit Dauer und verwendeter Substanz

Bis zum Eindecken mit Pertex (Mediate Mounting Medium, Mediate Cancer Diagnostics, Orlando, USA) verblieben die Schnitte in Xylol.

7.2.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit in Tabelle 4 dargestellten Protokollen, Antikörpern und Verdünnungen an der vollautomatischen Färbemaschine Bond RX (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der TU München durchgeführt.

Name	Ursprung	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung	Protokoll
CD31 abc.	Rabbit	abcam	1:50	ER2/30	IHC Rabbit polymer
CK7	Mouse	abcam	1:200	ER2/30	IHC F
HepPar1	Mouse	Dako	1:50	ER2/20	IHC F

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Antikörper und Protokolle einschließlich Ursprung, Hersteller, Verdünnung und Vorbehandlung

ER2/20 bzw. ER2/30 beschreibt eine hitzeinduzierte Epitop-Vorbehandlung mit EDTA (pH 9) über einen Zeitraum von 20 bzw. 30min.

Im Anschluss an die Vorbehandlung wurden die Schnitte für CD31 nach dem Protokoll „IHC Rabbit polymer“ mit folgenden Schritten und Reagenzien immunhistochemisch gefärbt (siehe Tabelle 5):

Schritt	Reagenz	Lieferant	Temperatur	Inkubation in Min.
1	Peroxide Block	Leica Microsystems	Umgebung	5:00
2	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
3	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
4	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
5	Marker			15:00
6	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
7	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
8	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
9	Polymer			8:00
10	Bond Wash Solution			2:00
11	Bond Wash Solution			2:00
12	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
13	Mixed DAB Refine	Leica Microsystems		Ca. 1:00
14	Mixed DAB Refine			10:00
15	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
16	Deionisiertes Wasser			Ca. 1:00
17	Deionisiertes Wasser			Ca. 1:00
18	Hematoxylin	Leica Microsystems		5:00
19	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
20	Bond Wash Solution	Leica Microsystems		00:30
21	Bond Wash Solution			00:30

Tabelle 5: Ablauf und verwendete Reagenzien des Protokolls „IHC Rabbit polymer“

Die immunhistochemische Färbung der Schnitte für CK7 und HepPar1 erfolgte anschließend an die Vorbehandlung nach dem Protokoll „IHC F“ (siehe Tabelle 6):

Schritt	Reagenz	Lieferant	Temperatur	Inkubation in Min.
1	Peroxide Block	Leica Microsystems	Umgebung	5:00
2	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
3	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
4	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
5	Marker			15:00
6	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
7	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
8	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
9	Polymer			8:00
10	Bond Wash Solution			2:00
11	Bond Wash Solution			2:00
12	Bond Wash Solution			2:00
13	Polymer			8:00
14	Bond Wash Solution			2:00
15	Bond Wash Solution			2:00
16	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
17	Mixed DAB Refine	Leica Microsystems	Ca. 1:00	
18	Mixed DAB Refine		10:00	
19	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
20	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
21	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
22	Hematoxylin	Leica Microsystems	5:00	
23	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
24	Bond Wash Solution	Leica Microsystems	Ca. 1:00	
25	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	

Tabelle 6: Ablauf und verwendete Reagenzien des Protokolls „IHC F“

7.2.3. Histologische Auswertung

Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem Mikroskop bzw. die eingescannte Version am Computer betrachtet und beurteilt. Für die Beurteilung der Perfusion anhand der CD31-Färbung wurden für jeden Tumor bei gleicher Vergrößerung (40-fach) die Gefäßanschnitte in 6 repräsentativen, gleichmäßig über den Schnitt verteilten Gesichtsfeldern gezählt und der Mittelwert daraus gebildet.

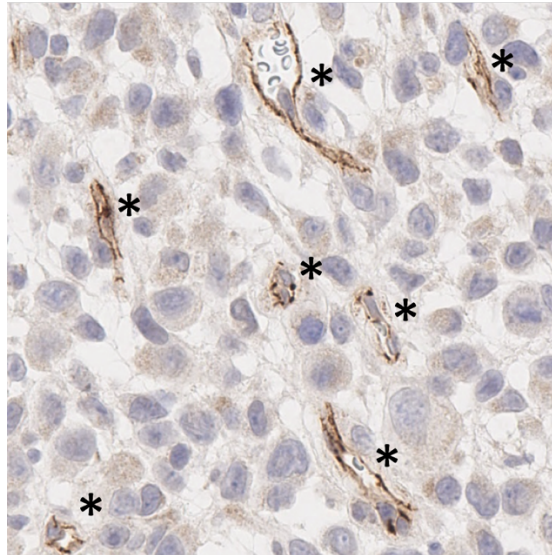


Abb. 13: Mikrographie einer CD31-Färbung; Gefäßanschnitte mit * gekennzeichnet

7.3. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Die qRT-PCR-Analyse wurde für eine Teilgruppe von 5 Tumoren in der urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Das für die PCR konservierte Teilstück des Tumors wurde in einem Milliliter Trizol LS (TRIzol LS Reagenz, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gekühlt homogenisiert (FastPrep-24 Tissue and Cell Homogenizer, MP Biomedicals, Santa Ana, USA), die Probe danach zentrifugiert (1 min, 4°C, 1000 g) und der Überstand für die RNA-Aufreinigung vollständig abpipettiert. Für die RNA-Ausfällung wurde Isopropanol (0,5 ml pro 0,75 ml vorgelegtem Trizol LS) hinzugefügt, die Probe bei Raumtemperatur 10 min inkubiert, zentrifugiert (15 - 30 min, 4°C, 12000 g) und das entstandene Pellet nach

Entfernen des Überstandes und zweimaligem Waschen mit 75%-igem Ethanol an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 25 - 50 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert (55°C, 10 min, 500 rpm) und auf Eis gelagert. Eventuell noch enthaltene DNA wurde mittels DNase-Verdau aus der Probe entfernt (DNA-free DNA Removal Kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Die Reverse Transkription, also das Umschreiben der RNA in cDNA mit Zufallsprimern erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems von ThermoFisher. Anschließend erfolgte die PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Microseal 'B' PCR Plate Sealing Filme, adhesive, optical; Hard-Shell 96-Well PCR Plates; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) unter Verwendung der TaqMan Gene Expression Assays Rn00820751_g1(LDHa), Rn99999916_s1 (GAPDH) sowie des TaqMan Gene Expression Master Mix von ThermoFisher.

Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wobei GAPDH als Referenzgen und die gesunde Leber einer Ratte als Referenzprobe diente.

8. Statistische Analyse

Die Normalverteilungsprüfung erfolgte mit dem *Pearson-D'Agostino omnibus K2-test*. Für Mittelwertsvergleiche normalverteilter Variablen wurde der *Student's t-test* angewendet. Korrelationen normalverteilter Variablen erfolgten mit *Pearson's r*. Ein zweiseitiges Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit *Prism* Version 7 (GraphPad Software) durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der isolierten Zellklone

Aus zwei Tumoren von unterschiedlichen DENA-induzierten Tieren sind nach Zellisolation neun Klone angewachsen und ließen sich weiter kultivieren. Sieben dieser Zellklone konnten durch die immunhistochemische Untersuchung auf CK7 und HepPar1 als HCC-Zellklone identifiziert werden, da sie eine HepPar1-positive und eine CK7-negative Färbung zeigten. Zwei weitere Klone zeigten eine CK7-positive Färbung und wurden deshalb ausgeschlossen.

Bei Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop zeigten alle Zellklone ein diffuses Wachstumsmuster. Allerdings wiesen sie Unterschiede in der Morphologie auf. Die errechnete Verdopplungszeit betrug 16,76 bis 24,23 Stunden. Die Verdopplungszeiten der Zellen sind in folgender Tabelle (siehe Tabelle 7) dargestellt.

Verdoppelungszeit [h]	Zellklon
16,76	HCC-EB-2
16,99	HCC-EB-1
18,26	HCC-EB-4
18,81	HCC-EB-7
19,22	HCC-EB-5
20,15	HCC-EB-6
24,23	HCC-EB-3

Tabelle 7: Verdopplungszeiten der isolierten Zellklone

Aus den sieben HCC-Zellklonen wurden für die weiteren Experimente exemplarisch die zwei Zellklone HCC-EB-2 und HCC-EB-3 ausgewählt. Diese beiden Klone waren diejenigen mit der kürzesten und längsten Verdopplungszeit und unterschieden sich in ihrer Morphologie. Während HCC-EB-2 Zellen ein kompaktes, eher rundliches bis kubisches Erscheinungsbild aufwiesen, waren die HCC-EB-3 Zellen eher pleomorph mit mehreren Zellausläufern (siehe Abb. 14).

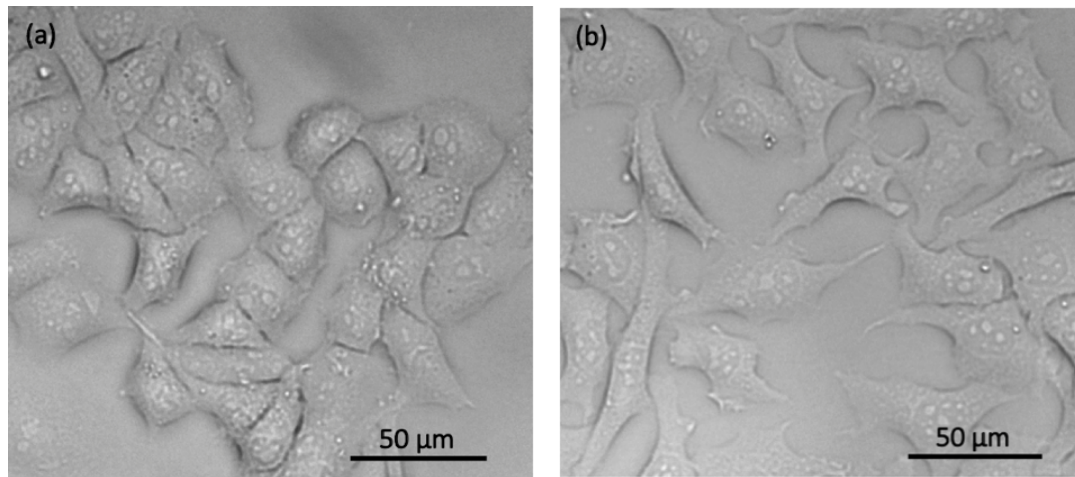


Abb. 14: Lichtmikroskopische Morphologie der Zellklone (a) HCC-EB-2 und (b) HCC-EB-3 *in vitro*

2. LDH-Aktivität ausgewählter Zellklone *in vitro*

Bei der Bestimmung der LDH-Aktivität der Zellen *in vitro* zeigte sich bei den beiden Zellklonen HCC-EB-2 und HCC-EB-3 ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$) in der Aktivität der Laktatdehydrogenase (siehe Abb. 15). In den dreimalig durchgeführten Messungen konnte für HCC-EB-3 mit im Mittel 3971 U/l eine signifikant höhere LDH-Aktivität pro einer Million Zellen bestimmt werden als bei HCC-EB-2 (2938 U/l). Die wiederholt gemessenen Werte betrugen bei HCC-EB-2 2820 U/l bis 3070 U/l, bei HCC-EB-3 3876 U/l bis 4058 U/l.

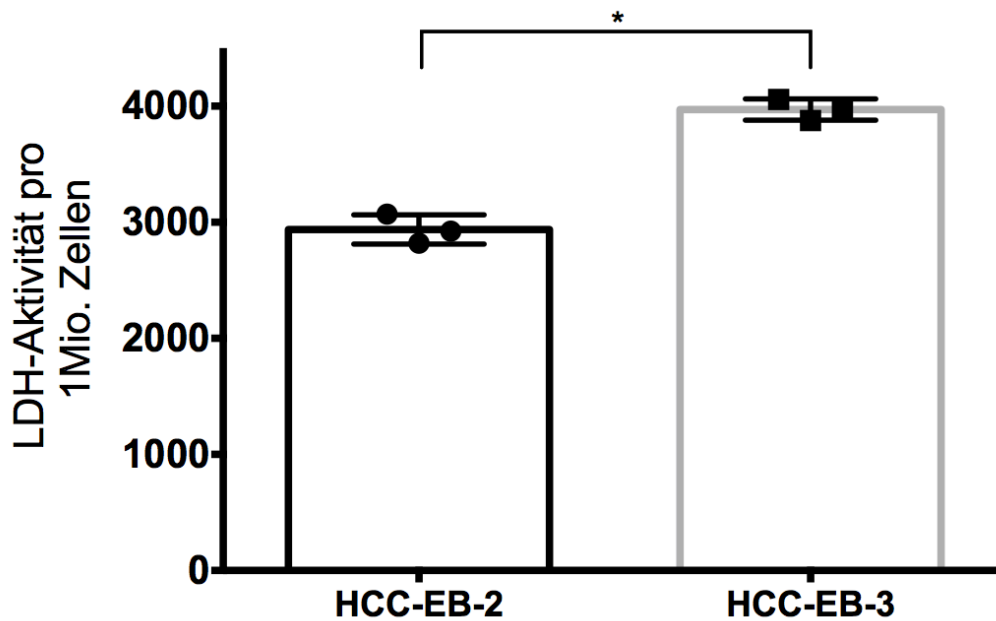


Abb. 15: LDH-Aktivität [U/l] der beiden Zellklone HCC-EB-2 und HCC-EB-3 in einer Million Zellen bei drei wiederholten Messungen; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,0003$

3. „Seahorse“-Analyse

Bei der Analyse der Glykolyserate der lebenden Zellen in Echtzeit zeigte die Zelllinie HCC-EB-2 eine niedrigere extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) als HCC-EB-3 (siehe Abb. 16). ECAR gilt bei dieser Analysemethode als Maß für die glykolytische Aktivität der Zellen, da mit dem Export des Laktats aus der Zelle gleichzeitig ein Protonenexport stattfindet. Je mehr Laktat also von der Zelle produziert und exportiert wird, umso höher wird ECAR.

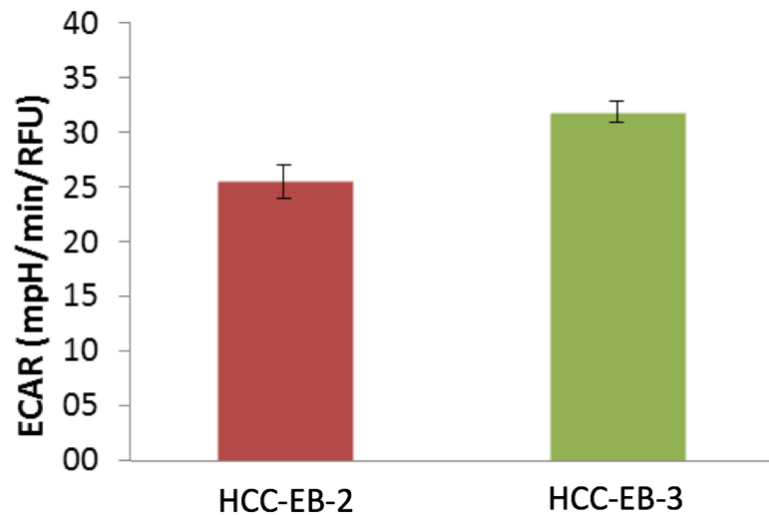


Abb. 16: Glykolytische Aktivität der Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3, ermittelt mit der „Seahorse“-Analyse anhand der extrazellulären Ansäuerungsrate (zur Verfügung gestellt von Dr. Marija Trajkovic-Arsic, Essen); *ECAR*: extracellular acidification rate, *RFU*: relative fluorescence unit

4. Manifestation der subkutanen Tumore

In allen zehn Nacktratten wuchsen jeweils beide implantierten Tumore an. Der Zeitraum von der Implantation der Tumore bis zur Messung betrug bei den Tieren 14 - 18 Tage, wobei sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0005$) zwischen beiden Zelllinien feststellen ließ (siehe Abb. 17). Die Tumore der Linie HCC-EB-3 wuchsen schneller und konnten im Mittel nach 14,8 Tagen gemessen werden, wohingegen die Tumore der Linie HCC-EB-2 aufgrund ihres langsameren Wachstums im Schnitt erst nach 16,6 Tagen gemessen werden konnten.

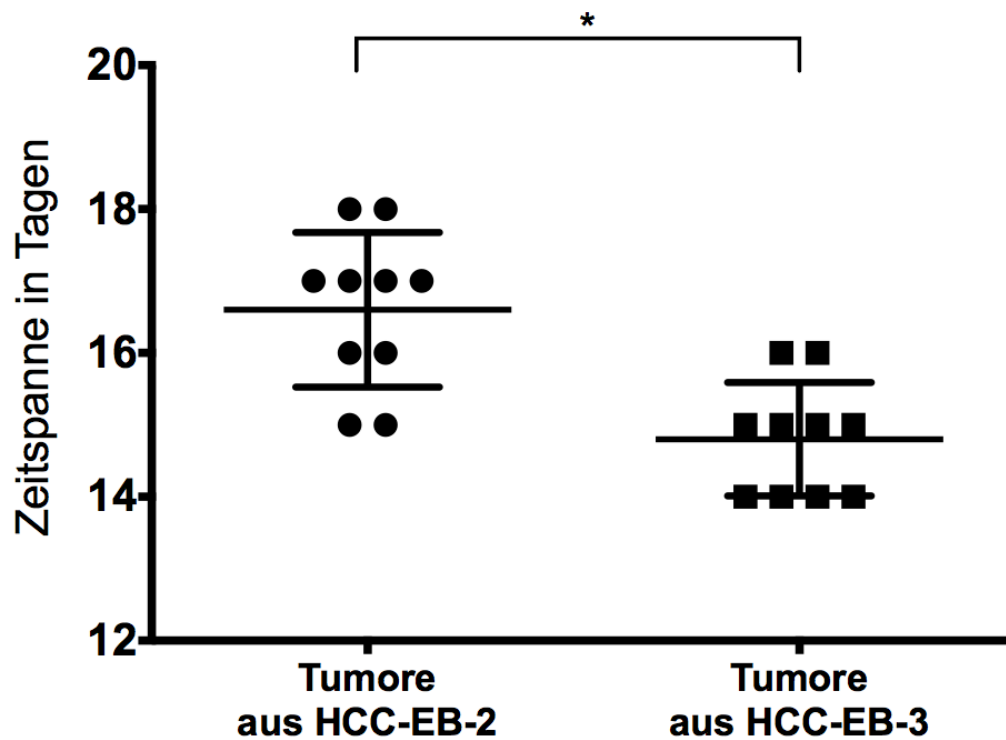


Abb. 17: Gruppierung der Zeitspanne von der Tumorimplantation bis zur Messung nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,0005$

Die Spanne der Tumorumfänge am Tag der Messung lag zwischen 245 und 1687,5 mm³. In der Verteilung der Tumorumfänge am Messtag zeigte sich kein Unterschied ($p = 0,925$) zwischen den beiden Tumorguppen (siehe Abb. 18), wohingegen die beiden Tumore in ein und demselben Tier zum Teil durchaus Unterschiede in der Größe aufwiesen.

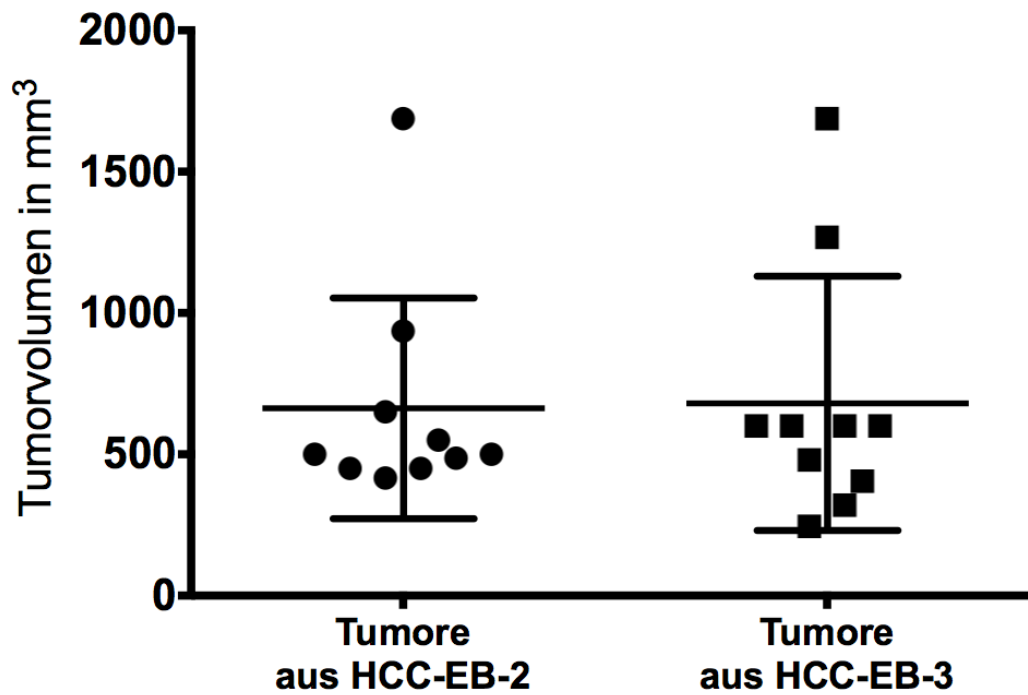
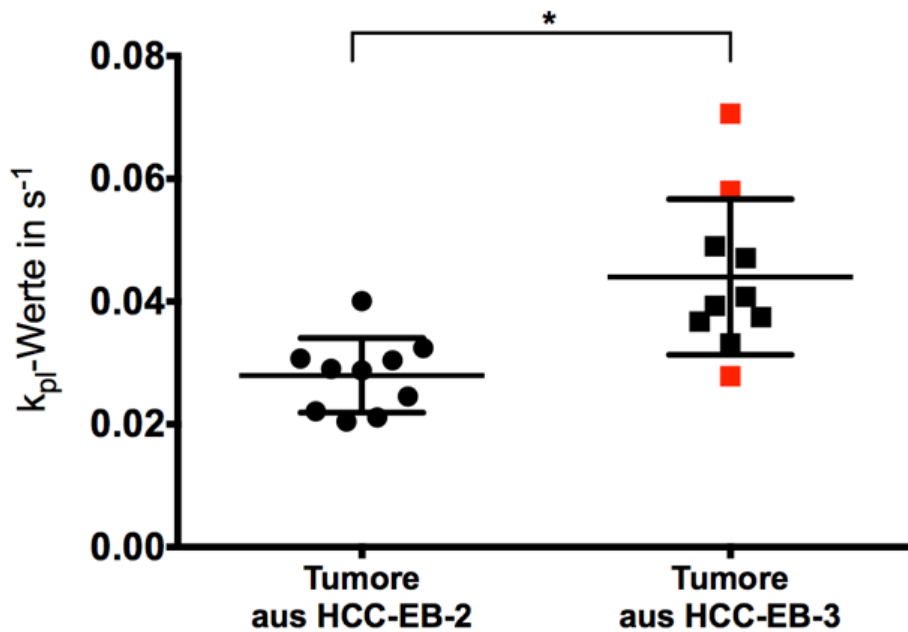


Abb. 18: Gruppierung der Tumolvolumina am Messtag nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung

5. Beurteilung der Umsetzung von ^{13}C -Pyruvat zu ^{13}C -Laktat in den Tumoren in der MRS

Durch die Modellierung der gemessenen Daten erhielt man für jeden Tumor ($n = 20$) einen k_{pl} -Wert, der die Umsetzungsrate von Pyruvat zu Laktat beschreibt. Man erhielt somit für die zwei Gruppen, bestehend aus je zehn Tumoren, im Mittel einen k_{pl} -Wert von $0,0280 \text{ s}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $0,0061 \text{ s}^{-1}$ für HCC-EB-2-Tumore bzw. $0,0440 \text{ s}^{-1}$ und $0,0127 \text{ s}^{-1}$ für HCC-EB-3-Tumore (siehe Abb. 19a), wobei sich die Tumorgruppen signifikant unterschieden ($p = 0,002$). Drei der modellierten Datensätze wurden mit einem Residuum von $> 0,7$, wie in Kapitel III. 6. beschrieben, als nicht ausreichend gut bewertet und ausgeschlossen. Damit blieben schlussendlich zwei weiterhin in ihren k_{pl} -Werten signifikant unterschiedliche Tumorgruppen ($p = 0,0006$). Die Tumore der Zelllinie HCC-EB-2 ($n = 10$) besaßen k_{pl} -Werte von $0,0280 \pm 0,0098 \text{ s}^{-1}$, die der Zelllinie HCC-EB-3 ($n = 7$) von $0,0405 \pm 0,0079 \text{ s}^{-1}$ (siehe Abb. 19b).

(a)



(b)

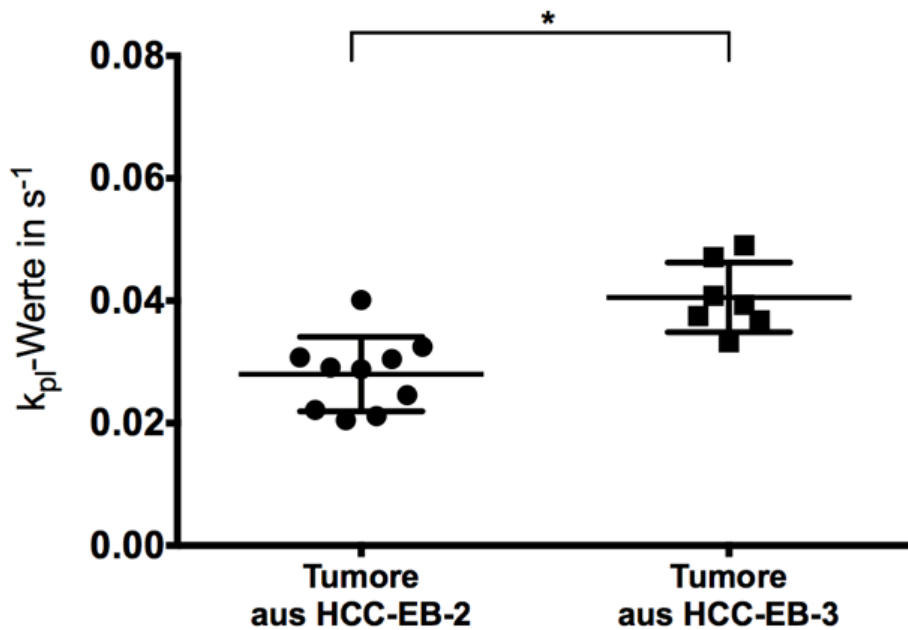
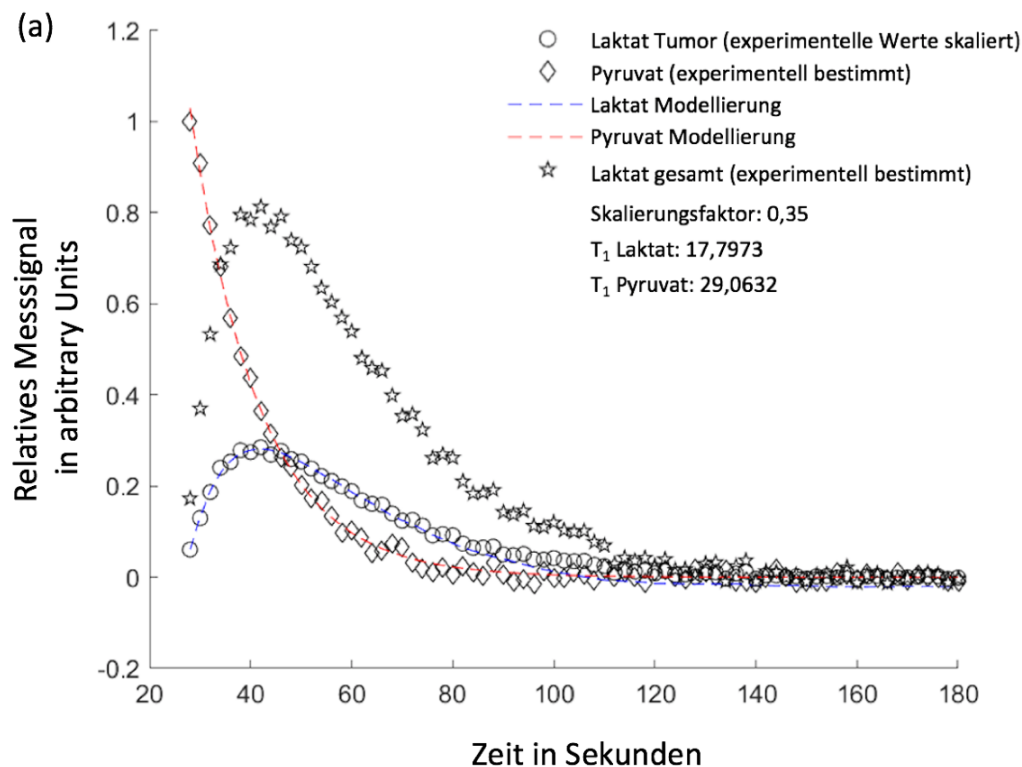


Abb. 19: Gruppierung der k_{pl} -Werte der Tumore nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3 (a) mit allen Datensätzen; rote Kennzeichnung der drei Datensätze mit Residuum > 0,7; *signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit $p = 0,002$; (b) ohne die drei ausgeschlossenen Datensätze; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit $p = 0,0006$

Durch die Datenmodellierung wurde festgestellt, dass nicht das ganze Laktat, das gemessen wurde, vom Tumor selbst produziert wurde, sondern dass in den einzelnen Tumoren unterschiedlich viel Laktat, das zum gemessenen Signal beitrug, in den Tumor eingespült wurde. Nachfolgend sind Beispiele für einen Tumor mit viel eingespültem Laktat und einen Tumor, bei dem nahezu das gesamte Laktat von dem Tumor selbst produziert wurde, dargestellt (siehe Abb. 20).



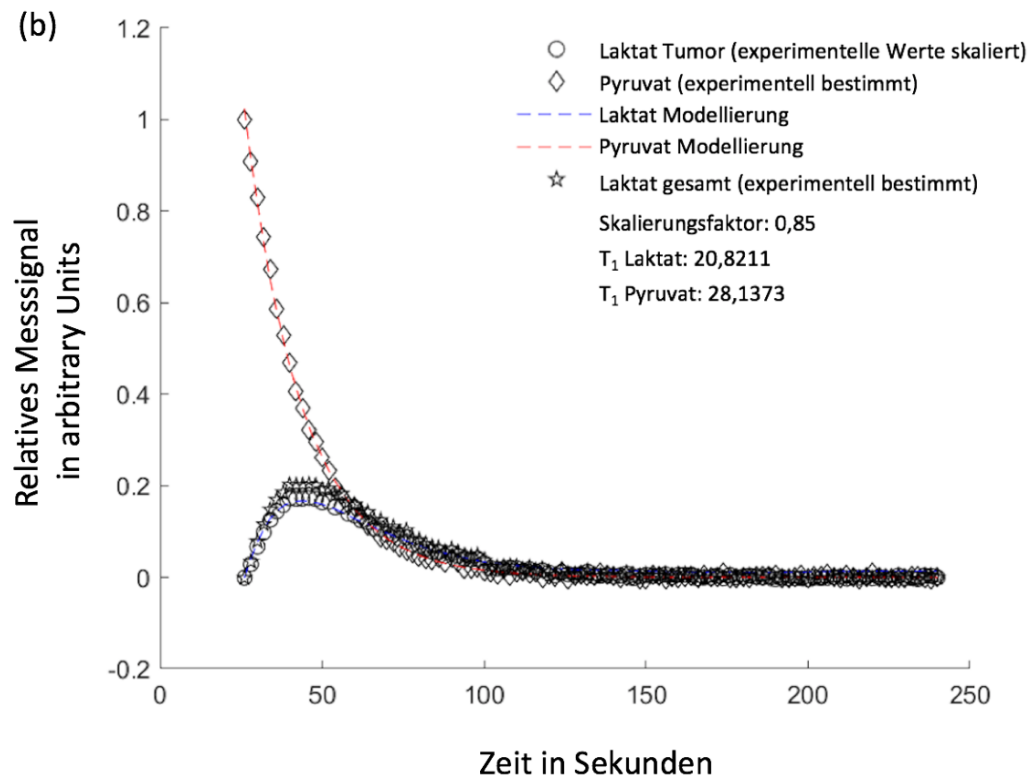


Abb. 20: Exemplarische Darstellung zweier Modellierungen: (a) eines Tumors mit einer großen Menge eingespültem Laktat, (b) eines Tumors mit kaum eingespültem Laktat

6. LDH-Aktivität im Tumorgewebe *ex vivo*

Übereinstimmend mit der LDH-Aktivität *in vitro* zeigte sich auch bei der LDH-Aktivitätsbestimmung der Tumore eine deutliche Auftrennung der beiden Gruppen. Die LDH-Aktivität der Tumore aus HCC-EB-2 ($n = 10$) betrug $68,71 \pm 19,72$ U/g, die derjenigen aus HCC-EB-3 ($n = 10$) $128,44 \pm 16,34$ U/g (siehe Abb. 21). Somit ist ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen festzustellen ($p < 0,0001$).

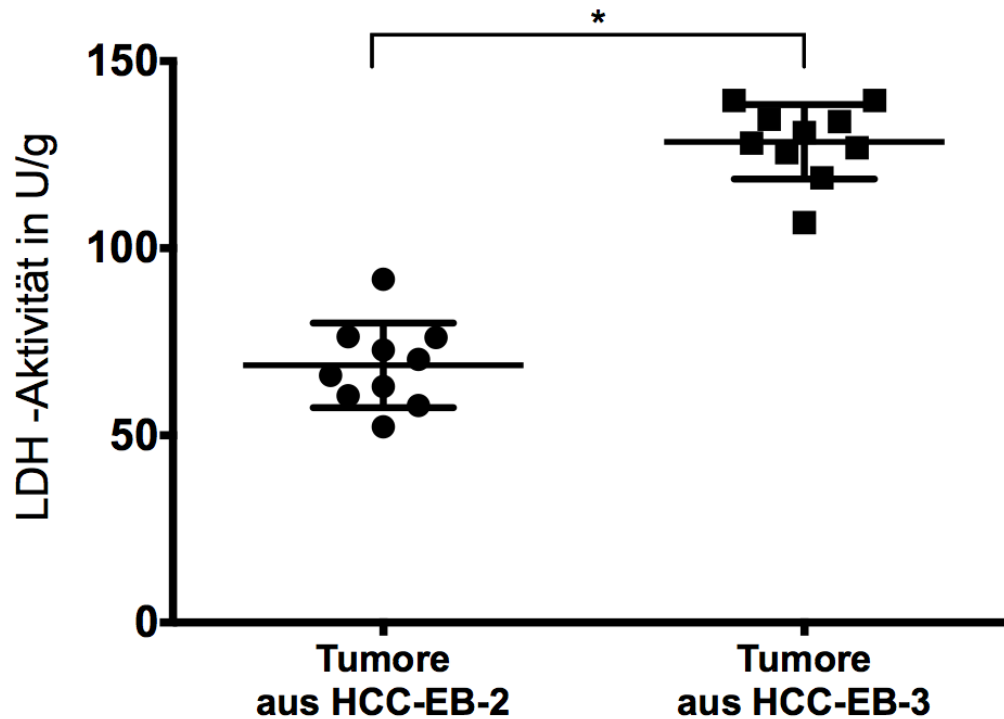


Abb. 21: LDH-Aktivität [U/g] im Tumorgewebe von insgesamt 20 subkutanen Tumoren, generiert aus der Zelllinie HCC-EB-2 bzw. HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p < 0,0001$

7. Korrelation zwischen k_{pl} -Werten und LDH-Aktivität im Tumor

Die Korrelation nach Pearson der LDH-Aktivität im Tumorgewebe mit den durch die Hyperpolarisations-MRS ermittelten k_{pl} -Werten zeigt eine positive Korrelation von $r = 0,7332$ und weist eine statistische Signifikanz auf (lin.Reg. $r^2 = 0,5376$; $p = 0,0008$; $n = 17$; siehe Abb. 22).

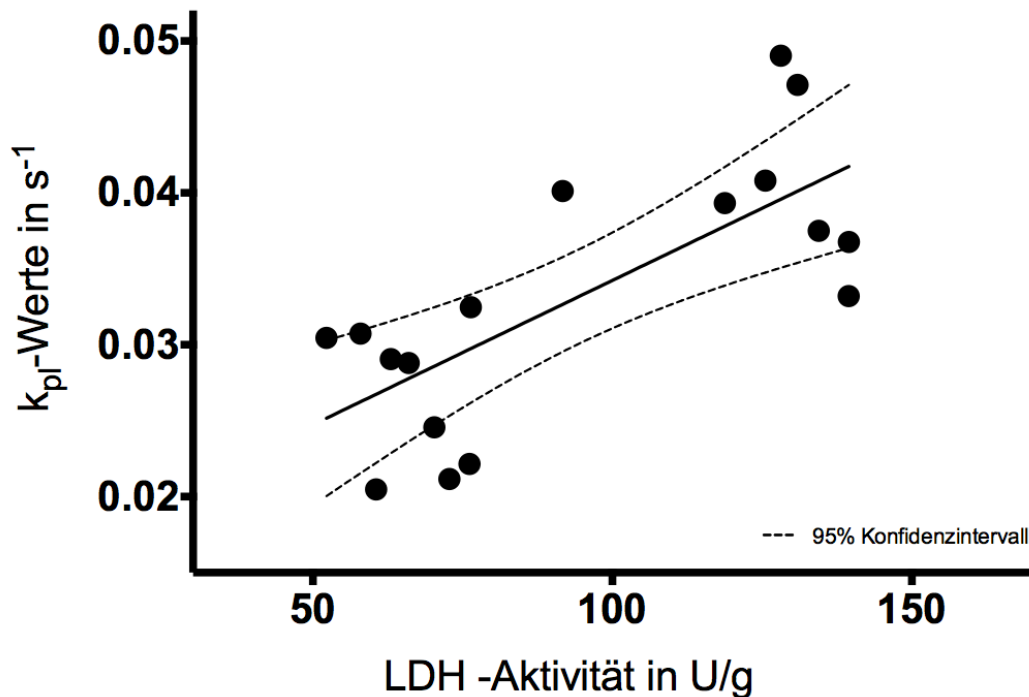


Abb. 22: Korrelation der k_{pl} -Werte mit der LDH-Aktivität der Tumore
 ($r = 0,7332$; $p = 0,0008$; lin.Reg. $r^2 = 0,5376$; $n = 17$)

8. qRT-PCR-Ergebnisse der Tumore

Es wurde exemplarisch an einer Subgruppe von 5 der subkutanen Tumore aus Nacktratten (HCC-EB-2: $n = 2$; HCC-EB-3: $n = 3$; siehe Abb. 23, schwarze Datenpunkte) eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Diese Daten wurden mit qRT-PCR-Daten aus Vorversuchen mit subkutanen Tumoren der Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3 in Wistar-Ratten (HCC-EB-2: $n = 3$; HCC-EB-3: $n = 2$; siehe Abb. 23, graue Datenpunkte) verglichen. Hierbei zeigte sich auf transkriptioneller Ebene (mRNA) der LDH A zwischen den Tumoren der beiden Zelllinien unabhängig vom Rattenstamm, in welchen die Tumore implantiert wurden, kein signifikanter Unterschied ($p = 0,648$).

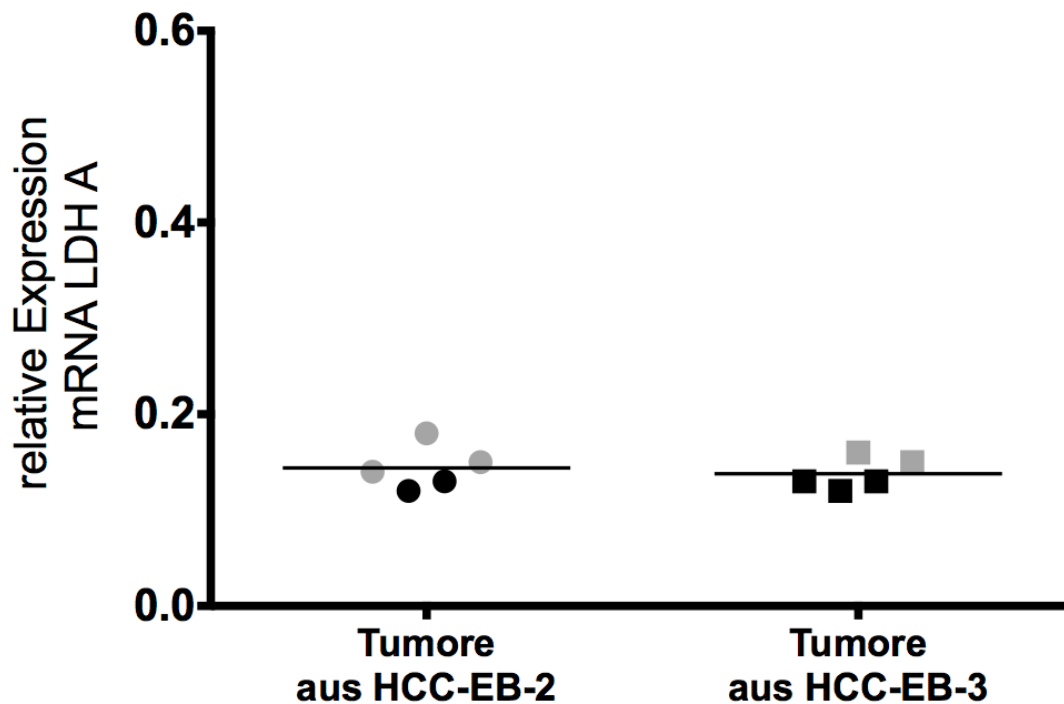


Abb. 23: Relative Expression der mRNA von LDH A, gruppiert nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; schwarze Datenpunkte: fünf exemplarisch ausgewählte Tumore dieser Studie; graue Datenpunkte: Tumore aus Vorversuchen in Wistar-Ratten

9. Histologie der Tumore

Alle Tumore wiesen in der HE-Färbung typische HCC-Charakteristika auf. Sie zeigten ein solides Wachstumsmuster mit fibrovaskulärer Stromabegleitung. Die Tumorzellen besaßen moderate Mengen an eosinophilem oder basophilem Zytoplasma, zeigten eine deutliche Pleomorphie, zelluläre Atypien und atypische Mitosen. Bei einigen Zellen waren unterschiedlich große, nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung in der HE-Färbung optisch leer erscheinende Vakuolen vorhanden. Diese Morphologie ist vereinbar mit einer für das HCC typischen Verfettung der Tumorzellen.

Die aus der Linie HCC-EB-2 entstandenen Tumore zeigten phänotypisch tendenziell größere, voneinander abgrenzbare Bereiche entweder mit soliden oder vakuolisierten Tumorzellen. Dagegen erschienen in HCC-EB-3-Tumoren solide Tumorzellen eher diffus zwischen den vakuolisierten Zellen verteilt (siehe Abb. 24).

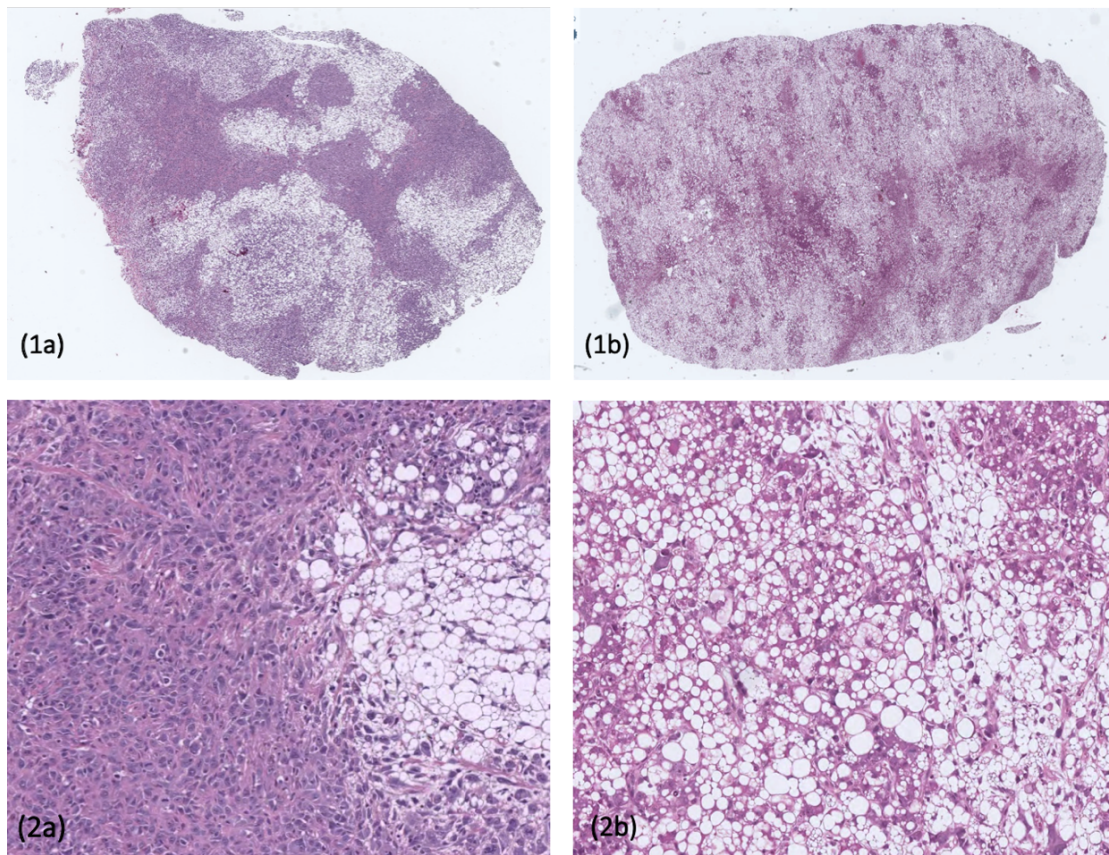


Abb. 24: HE-Färbung der subkutanen Tumore, (1a) entstanden aus Linie HCC-EB-2 bzw. (1b) aus Linie HCC-EB-3; (2a) Teilausschnitt aus 1a in stärkerer Vergrößerung; (2b) Teilausschnitt aus 1b in stärkerer Vergrößerung

In der Vaskularisierung der Tumore, bestimmt mit Hilfe der CD31-Färbung, konnten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,832$) zwischen den Tumoren festgestellt werden. Die Gruppe der HCC-EB-2-Tumore zeigte im Mittel 16,56 Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld, die Gruppe der HCC-EB-3-Tumore 16,98 Gefäßanschnitte pro Gesichtsfeld.

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zwei isolierte HCC-Zellklone unter gleichen Bedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Unterschiede im Laktatstoffwechsel aufweisen und die Hyperpolarisations-Magnetresonanzspektroskopie unter Berücksichtigung bestimmter Einflussfaktoren *in vivo* als nicht invasive Untersuchungsmethode zur Differenzierung der beiden Tumorgruppen geeignet ist.

Es konnten hinsichtlich der signifikant unterschiedlichen Laktatbildungsraten in der MRS zwei Gruppen von Tumoren gebildet werden. Die HCC-EB-3-Tumore wiesen hier eine höhere Laktatbildungsrate auf als die HCC-EB-2-Tumore. Diese Ergebnisse wurden durch die *ex-vivo*-Bestimmung der LDH-Aktivität, welche als Validierung der *in-vivo*-Messung der Laktatproduktion benutzt wurde, bestätigt. Hier wiesen die HCC-EB-3 Tumore ebenfalls eine signifikant höhere Aktivität als die HCC-EB-2-Tumore auf. Auch die individuelle Korrelation der gemessenen Laktatproduktionsraten der einzelnen Tumore mit der LDH-Aktivität im Tumorgewebe zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang der beiden Größen. Weil Laktat nur durch die Umsetzung von Pyruvat mittels der Laktatdehydrogenase gebildet werden kann, ist die LDH-Aktivität im Gewebe eine gut geeignete Validierungsmethode der durch die Spektroskopie ermittelten Laktatproduktionsrate (Hu *et al.*, 2011; Serrao *et al.*, 2016). Die vorhandene Streuung bei der Korrelation lässt sich dadurch erklären, dass die Laktatproduktion *in vivo* noch von anderen Parametern als der LDH-Aktivität beeinflusst wird: Zunächst muss das injizierte Pyruvat über den Blutkreislauf zum Tumor gelangen. In dieser Studie wurden bei den Tumoren durch die immunhistochemische CD31-Färbung keine Unterschiede in der Vaskularisierung festgestellt, was vermuten lässt, dass eine Beeinflussung der k_{pl} -Werte durch den Transport des Pyruvats zum Tumor in diesem Modell eine untergeordnete Rolle spielt. Einen weiteren Einflussfaktor stellen die Monocarboxylat-Transporter (MCT) dar. Bevor das Pyruvat in der Zelle zu Laktat umgesetzt werden kann, muss es in die Zelle hineingelangen. Dies geschieht hauptsächlich durch die Isoform MCT1. Eine Änderung der Expression oder Hemmung dieses Transporters hat also auch Einfluss auf die in der Hyperpolarisationsspektroskopie gemessene Laktatbildungsrate (Harris *et al.*, 2009; Lodi, Woods and Ronen, 2013). Darüber hinaus ist die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat abhängig vom Vorhandensein des für diese Reaktion benötigten Cofaktors NADH sowie der Größe des

endogenen Laktatpools (Day *et al.*, 2007). Und schließlich muss konstatiert werden, dass die Umsetzung von Pyruvat in andere Metaboliten als Laktat hier nicht berücksichtigt wurde, *in vivo* aber stattfindet.

Bei der Aufteilung der Zelllinien nach der LDH-Aktivität deckten sich die Ergebnisse der *in-vitro*- und *ex-vivo*-Enzymaktivitätsbestimmung. HCC-EB-3 zeigte *in vitro* eine höhere LDH-Aktivität als HCC-EB-2. Diese Ergebnisse sind konform mit den Resultaten der „Seahorse“-Analyse, welche durch den Schlüsselindikator der höheren extrazellulären Ansäuerungsrate eine höhere glykolytische Aktivität und Laktatbildung anzeigt. HCC-EB-3 wies auch bei dieser Analysemethode eine höhere extrazelluläre Ansäuerungsrate und somit eine höhere glykolytische Aktivität und Laktatproduktion auf.

In Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit verhielten sich die beiden Zellklone *in vitro* und *in vivo* dagegen invers. Die Zelllinie HCC-EB-3 wies *in vitro* die langsamste Verdopplungszeit auf, wohingegen sie *in vivo* deutlich schneller wuchs als die *in-vitro*-schnellste Linie HCC-EB-2. Eine mögliche Ursache ist, dass die für die Tumorzellbiologie wichtige Interaktion mit der Mikroumgebung (z.B. Dimensionalität, Rezeptor-Liganden-Interaktion bei der Zelladhäsion, Signalwege), welche *in vivo* zum Tragen kommt, *in vitro* bei der Kultur der adhären Zellen in Plastikgefäßen fehlt (Kenny *et al.*, 2007; Holle, Young and Spatz, 2016; Santos, Colaço and Oliveira, 2017). Es ist also davon auszugehen, dass die kürzere Verdopplungszeit der HCC-EB-2-Zellen *in vitro* auf einer besseren Angepasstheit an das einschichtige Wachstum im Kulturgefäß beruhte ohne die Wachstumsgeschwindigkeit und Aggressivität der Tumorzellen *in vivo* widerzuspiegeln.

Dagegen spiegelte die Zellmorphologie *in vitro* die Aggressivität der jeweiligen Zelllinie *in vivo* wider. Der Klon HCC-EB-2 wies eine rundliche bis kubische, kompakte Form auf, wohingegen die HCC-EB-3-Zellen, welche in der Studie Anzeichen für eine höhere Aggressivität zeigten (schnelleres Wachstum *in vivo*, höhere LDH-Aktivität und Laktatproduktion *in vitro* und *in vivo*) ein pleomorphes Erscheinungsbild mit einigen Zellausläufern aufwiesen. Eben solche Unterschiede in der Zellmorphologie konnten Muenzner *et al.* in ihrer Studie nachweisen. In dieser zeigte der aggressivere Zellklon 5 (ein von der HCC-Zelllinie HepG2 stammender Subklon mit gesteigertem hepatozellulärem Krebsstammzellpotential) in der 2D-Kultur eine bi- bis tripolare Erscheinung mit deutlicher Ausbildung von Zellausläufern, wohingegen ein zweiter aus HepG2 generierter Subklon sowie die ursprünglichen HepG2-Zellen eine rundliche

Morphologie besaßen (Muenzner *et al.*, 2018). Dies lässt darauf schließen, dass das vermehrte Vorhandensein von Zellausläufern *in vitro* bei HCC-Zellen einen Hinweis auf eine aggressivere Zelllinie gibt.

Die aus HCC-EB-2 entstandenen Tumore, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine niedrigere LDH-Aktivität sowie in der Spektroskopie eine niedrigere Laktatbildungsrate aufwiesen, zeigten *in vivo* ein langsames Wachstum als die HCC-EB-3-Tumore. Die beobachteten Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Tumorgruppen *in vivo* bestätigten die Ergebnisse anderer Studien, die zeigten, dass eine niedrigere LDH-Aktivität und Laktatproduktion mit einem langsameren Tumorwachstum und geringerem Metastasierungspotential einhergehen und somit als Anhaltspunkt für eine geringere Aggressivität der Tumorzellen angesehen werden können. Eine LDH-A-Inhibition durch shRNA *in vivo* führte im Mausmodell bei Brustkrebszellen zu einem verminderten Tumorwachstum, geringeren Laktatkonzentrationen im Tumor (gemessen mit MRSI) und einer geringeren Metastasierungsrate (Rizwan *et al.*, 2013). Auch HCC-Zellen zeigten bei LDH-Knockdown *in vivo* ein reduziertes Tumorwachstum und ein niedrigeres Metastasierungspotential (Sheng *et al.*, 2012).

In der für eine exemplarische Subgruppe an Tumoren durchgeführten qRT-PCR zeigten sich bei der LDH A-Expression auf Ebene der mRNA keine signifikanten Unterschiede. Dieser Trend setzte sich auch im Vergleich mit dem mRNA-Level von Tumoren der beiden Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3 (generiert in Wistar-Ratten) fort. Somit liegt der Schluss nahe, dass unabhängig vom genetischen Hintergrund des tumortragenden Rattenstamms eine posttranskriptionale Regulation der Laktatdehydrogenaseaktivität für die Unterschiede in der hier beobachteten Aktivität dieses Enzyms verantwortlich ist. Die posttranskriptionale Regulation von LDH A erfolgt über die Phosphorylierung und Acetylierung von Aminosäureresten. So führt beispielsweise die Phosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 83 zu einer bevorzugten Substrat-Bindung von NADH und die Phosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 10 fördert die Formation des aktiven Tetramers des Enzyms. Eine Acetylierung des Lysinrestes an Position 5 hat dagegen den Abbau des Enzyms zur Folge (Valvona *et al.*, 2016). Dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden konnte, kann aber auch auf eine mögliche Inkonzanz des Referenzgens GAPDH, welches für die Auswertung der qRT-PCR zur Anwendung kam, zurückzuführen sein (siehe Kapitel V. 2. 7.).

Die zum Teil beobachteten Unterschiede im Wachstum der beiden Tumore innerhalb

einer Ratte (trotz Tumorimplantation mit gleicher Zellzahl auf beiden Seiten des Tieres) lassen sich durch die Geschwindigkeit, mit der die Zellen nach der Implantation Anbindung an die Gefäßversorgung fanden, erklären. Für das Tumorwachstum wird die Angiogeneese, verursacht durch die Interaktion von Tumor- und Wirtszellen, als essentiell angesehen, aber subkutanes Gewebe ist eher wenig vaskularisiert (Varna, Bertheau and Legrès, 2014; Robertson *et al.*, 2016). So konnte in einem Tier die Angiogeneese bei den beiden implantierten Tumoren unterschiedlich schnell voranschreiten, je nach genauer Position der implantierten Zellen im subkutanen Gewebe. Die Ergebnisse der CD31-Färbung der Tumore lassen aber vermuten, dass sich die Geschwindigkeit der Angiogeneese in den Tumoren nicht auf die später vorhandene Anzahl an Gefäßen auswirkte, da hier zwischen den Tumoren keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden konnten. Das teilweise auftretende unterschiedliche Wachstum der beiden Tumore in einem Tier führte zu der vorhandenen Streuung der Tumorumfänge am Messtag. Da die Ratten direkt nach der Hyperpolarisationsmessung euthanasiert werden mussten, um die Tumore zur weiteren Analyse zu entnehmen, war es nicht möglich, immer alle Tumore bei gleicher Größe zu messen. Dies könnte durch einen Tumor pro Tier verhindert werden, würde aber die benötigte Versuchstierzahl zum Erlangen der gleichen Menge an Daten verdoppeln und somit dem Prinzip der 3R (siehe Kapitel V. 2.) - Vermeidung (Replacement), Verbesserung (Refinement), Verringerung (Reduction) als Maßnahme zur Reduzierung der Versuchstierzahlen und der Belastungen für Versuchstiere - entgegenstehen.

Bei der Modellierung der Spektroskopiedaten fiel auf, dass das im Tumor gemessene Laktat nicht nur im Tumor produziert worden sein konnte, sondern ein Teil des Laktats aus anderen Bereichen des Körpers stammen musste und in den Tumor eingespült wurde, was bei der weiteren Aufarbeitung der Daten mit eingerechnet wurde. Dies zeigten beispielsweise auch Wespi *et al.* für den Laktatstoffwechsel im Herzen. Sie wiesen nach, dass die Laktatproduktion, basierend auf dem gemessenen ^{13}C -Laktatsignal im Herzen nach einer Injektion mit hyperpolarisiertem $[1-^{13}\text{C}]\text{Pyruvat}$, bei der schichtselektiven Spektroskopie durch den Beitrag der Leber zum Laktatsignal überschätzt wurde (Wespi *et al.*, 2018). Das in die Tumore eingespülte Laktat kann aus anderen Organen und der Umsetzung von Pyruvat im Blut stammen. Da pro Ratte zwei Tumore implantiert wurden, ist aber auch denkbar, dass von einem Tumor produziertes Laktat über die Blutbahn in den anderen Tumor eingetragen wurde. Diese Vermutung wird zum Teil durch die kürzlich von Serrao *et al.* veröffentlichten Ergebnisse gestützt

(Serrao *et al.*, 2018), laut deren Studie tumortragende Mäuse einen deutlich höheren Blutlaktatspiegel haben als gesunde Tiere und der relativ hohe ^{13}C -Laktatanteil im Blut der Tiere nach einer ^{13}C -Pyruvatinjektion durch die messbare Abgabe von hyperpolarisiertem ^{13}C -Laktat des Tumors aus den Zellen sowie durch den ^{13}C -Laktatexport aus anderen Geweben erklärt werden kann. Allerdings wurde dieses zirkulierende ^{13}C -Laktat in deren Hyperpolarisationsbildgebung nicht erfasst, weshalb Serrao *et al.* in ihrer Studie den Schluss zogen, dass das zirkulierende ^{13}C -Laktat anfänglich zu niedrig konzentriert war und im Verlauf des Experiments zu viel Polarisation verloren hat, um in der Hyperpolarisationsbildgebung detektiert zu werden. Diesem Schluss stehen die in vorliegender Studie ermittelten Resultate entgegen, nach denen eingespültes ^{13}C -Laktat bei der Hyperpolarisationsmessung durchaus eine zu berücksichtigende Rolle spielt. Dass sich die in den Tumor eingespülten Laktatmengen von Tier zu Tier unterscheiden, weist auf individuell unterschiedliche Einflussfaktoren auf den gesamten Laktatstoffwechsel des Tieres hin. Zu diesen Einflussfaktoren kann unter anderem der Makrometabolismus der Ratten gezählt werden, der von Tier zu Tier differieren kann. Aber auch die unterschiedliche Sensibilität der Ratten gegenüber Stressoren (z.B. Handling, Transport, Geräusche) während der Versuchsvorbereitung stellt eine mögliche, den Blutlaktatwert der Tiere beeinflussende Komponente dar (Teague *et al.*, 2007). Nach Herausfiltern des Signals von nicht im Tumor produziertem Laktat ließen sich die beiden Tumorgruppen - wie oben beschrieben - aufgrund ihrer unterschiedlichen Umsetzungsraten von Pyruvat zu Laktat (ermittelt aus den mit Hyperpolarisations-MRS gemessenen Daten) trotz des individuell unterschiedlichen Laktatmakrometabolismus‘ differenzieren. Basierend auf dem Vergleich mit Literaturwerten können die in dieser Studie ermittelten k_{pl} -Werte als realistisch angesehen werden. Die für HCC-EB-2-Tumore erhaltenen k_{pl} -Werte besitzen beispielsweise eine vergleichbare Größenordnung zu den von Hundshammer *et al.* für ein subkutanes Brustkrebsmodell in der Ratte ermittelten Werten (Hundshammer, Braeuer, *et al.*, 2018).

Histologisch wiesen die Tumore aus beiden Zelllinien eindeutige HCC-Charakteristika auf und somit ließ sich das Vorliegen von HCC-Zelllinien zusätzlich zur IHC-Charakterisierung *in vitro* nochmals bestätigen. Die Histologie der Tumore ließ weiterhin den Schluss zu, dass einige Tumorzellen über einen gestörten Fettstoffwechsel verfügten, wenn auch - je nach zugrunde liegender Zelllinie - unterschiedlich über den gesamten Tumor verteilt. Ein veränderter Fettstoffwechsel stellt bei Tumorzellen ein

bekanntes Phänomen dar. So zeigten Guri *et al.* in ihrer Studie einen eindeutigen Zusammenhang zwischen gesteigerter Fettsäure- und Lipidsynthese und der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms, vermittelt durch die Serin/Threonin-Kinase mTORC2 (Guri *et al.*, 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen, lässt sich vermuten, dass die homogenere Verteilung der vakuolisierten Tumorzellen der Linie HCC-EB-3 und deren schnelleres Tumorstadium in Verbindung stehen. Die Evaluierung der Rolle des Fettstoffwechsels im HCC war allerdings nicht Teil dieser Studie und erfordert deshalb genauere Untersuchungen in weiteren Projekten.

2. Diskussion der Methodik

Beim Einsatz von Versuchstieren in der Forschung ist gemäß tierschutzrechtlicher Aspekte auf eine Beschränkung der Tierzahl auf ein unerlässliches Maß zu achten. Die Vorgehensweise bei dieser Arbeit, die Zellen zuerst *in vitro* zu charakterisieren und danach exemplarisch zwei sich unterschiedlich verhaltende Klone *in vivo* zu untersuchen, statt alle isolierten Klone direkt *in vivo* zu untersuchen, erfolgte im Sinne der 3R (Replacement, Refinement, Reduction), einem von Russell und Burch entwickelten Prinzip (W.M.S. Russell and R.L. Burch, 1959). Replacement bezeichnet dabei den Ersatz von Tierversuchen durch andere Methoden wie *in-vitro*-Versuche, welcher sich in Teil eins dieses Versuchs widerspiegelt. Refinement, also die Minimierung der Belastung der Versuchstiere, wurde bei der Wahl der subkutanen statt orthotopen Tumorumplantation berücksichtigt und die sogenannte Reduction, die eine Verringerung der Versuchstierzahl auf ein nötiges Minimum bedeutet, wurde durch die Implantation von nur zwei exemplarisch gewählten Zelllinien mit zwei Tumoren pro Tier umgesetzt. Die Beurteilung der Laktatbildung mittels Hyperpolarisations-MRS kann aber nur in einem lebenden Organismus mit schlagendem Herzen und vorhandenem Stoffwechsel erfolgen, weshalb in Teil zwei des Experiments ein Tierversuch unumgänglich war.

2.1. Tiermodell

Wie bereits in Kapitel II. 1. 1. beschrieben, entsteht das humane hepatozelluläre Karzinom hauptsächlich in durch Fibrose, Zirrhose und Entzündung veränderten Lebern. Das chemisch induzierte Modell mittels Diethylnitrosamin führt ebenfalls zu einer HCC-Entstehung in einer chronisch geschädigten Leber und ähnelt so den humanen Prozessen der Karzinogenese stark (Groß *et al.*, 2015). Auch auf genetischer

Ebene konnte eine starke Ähnlichkeit dieses Modells mit der Genetik humaner HCC-Fälle mit schlechter Überlebensrate nachgewiesen werden (Lee and Thorgeirsson, 2006). Deshalb wurde dieses Modell als geeignet zur Isolation einzelner Zellklone erachtet, die der späteren Translation der Methode in die Klinik dienen sollten. Ratten eignen sich für die Forschung in diesem Bereich der Bildgebung aufgrund ihrer Größe besser als Mäuse. Aus eigenen Vorversuchen ist bekannt, dass die Zelllinien, obwohl sie aus Wistar-Ratten isoliert wurden, in selbigen keine gute Tumorangehrate aufweisen. Als Grund hierfür wird die volle Immunkompetenz dieser Ratten und eine daraus resultierende antitumorale Immunreaktion trotz allogener Zellen vermutet (Buijs *et al.*, 2012). Deshalb wurde als Tiermodell für die Implantation die thymusdefiziente Nacktratte Crl:NIH-Foxn1^{nu} gewählt. Diese eignet sich gut für die Tumorforschung, weil sie aufgrund ihrer Thymuslosigkeit und daraus resultierender T-Zell-Defizienz sogar artfremde Tumorzellen nicht abstößt. Da sie aber normale B- und NK-Zellen besitzt, verfügt diese Ratte trotzdem über eine Immunabwehr (de Jong *et al.*, 1980; Andresen *et al.*, 2001).

Das Alter der Tiere (6 - 8 Wochen bei Studienbeginn) wurde so gewählt, weil sie in diesem Zeitraum zum einen groß genug für die Bildgebung sind, zum anderen aber noch nicht so alt, dass aufgrund der steigenden Immunkompetenz mit zunehmendem Alter der Tiere eine schlechtere Tumorangehrate zu erwarten wäre, wie es Maruo *et al.* zeigten (Maruo *et al.*, 1982).

Es wird angenommen, dass Östrogen in Zusammenhang mit dem hepatozellulären Karzinom einen protektiven Effekt ausübt (Yang *et al.*, 2012). Um ein durch diesen Effekt verursachtes verschlechtertes Tumorstadium zu verhindern, wurden für diese Studie nur männliche Tiere verwendet.

2.2. In-vitro-Versuche

Um bei den aus Lebertumoren isolierten Klonen sicherzugehen, dass es sich um HCC-Zelllinien und keine Cholangiokarzinomzellen handelt, wurde eine immunhistochemische Färbung auf Zytokeratin 7 (CK7) und Hepatocyte Paraffin 1 (HepPar1) durchgeführt. HepPar1 reagiert mit Zellen hepatozytären Ursprungs, wohingegen nichtparenchymatöse Leberzellen wie Gallengangszellen und daraus hervorgehende Cholangiokarzinomzellen nicht angefärbt werden (Siddiqui *et al.*, 2002). Dagegen sind Cholangiokarzinomzellen CK7-positiv und HCC-Zellen nicht (Jain, 2014). Klone mit der Anfärbbarkeit HepPar1+/CK7- wurden also als HCC-Klone eingestuft.

Es gibt viele Faktoren, die *in-vitro*-Experimente beeinflussen können. Deshalb wurde darauf geachtet, die Bedingungen für diese Versuche möglichst konstant zu halten. Um einen Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf die Zellen zu verhindern, wurden alle Klone im gleichen Medium kultiviert. Des Weiteren wurden kurz nach der Zellisolation viele Zell-Aliquots derselben niedrigen Passagenummer eingefroren, um auch für zeitlich versetzt stattfindende Experimente immer „junge“ Zellen zur Verfügung zu haben, denn mit steigender Passagenummer steigt auch die Wahrscheinlichkeit für Mutationen der Zellen und somit für ein Differieren der Charakteristika (Thompson, Kunkel and Ehrhardt, 2014). Nach dem Auftauen wurden die Zellen mindestens zweimal passagiert, damit sie nach dem Stress des Auftauens wieder einen normalen Zellzyklus etablieren konnten, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.3. Implantation

Um auch bei der Tumorimplantation die Voraussetzungen möglichst konstant zu halten, wurden die Zellen aus in Kapitel V. 2. 2. dargelegten Gründen immer frisch aufgetaut und nach einer gewissen „Normalisierungszeit“ mit niedriger Passagenummer implantiert. Außerdem wurde immer die gleiche Zellzahl an der gleichen Stelle implantiert.

Die subkutane Tumorimplantation wurde gewählt, weil die Tumore exponiert an der Körperoberfläche platziert werden konnten. Dadurch war es möglich, die Oberflächenspulen, welche nur über einen begrenzten Sensitivitätsbereich zur Signalerfassung verfügen, direkt auf den Tumoren zu platzieren, um deren gesamtes Signal vollständig zu erfassen. Darüber hinaus erlaubte die exponierte Lage der Tumore eine sehr selektive Positionierung der Schichten für die Hyperpolarisationsbildgebung, ohne viel Tumor umgebendes Gewebe mit einzuschließen. Durch die Implantation in der hinteren Körperhälfte musste bei der Spektroskopie nicht mit Störungen durch atmungsbedingte Bewegungen der Tiere gerechnet werden. Außerdem stellt die subkutane Implantation für die Ratten eine geringere Belastung dar als eine orthotope Tumorimplantation. Trotzdem bleibt festzuhalten, dass die Zellen sich bei einer subkutanen Implantation in einem Mikromilieu befinden, welches die Bedingungen für die Tumorzellen in der Leber nicht adäquat widerspiegelt (Santos, Colaço and Oliveira, 2017).

Um zu verhindern, dass die beiden Zelllinien aufeinander Einfluss nehmen und so das metabolische Verhalten der jeweils anderen Linie verändern, wurden bei einem Tier

immer nur zwei Tumore derselben Zelllinie implantiert.

2.4. ^{13}C -MRS

Um die Beeinflussung der Experimente durch äußere Einflüsse auf das Tier so klein wie möglich zu halten, wurden Anästhesiedauer sowie Atemfrequenz und Temperatur der Tiere bei der Bildgebung möglichst konstant gehalten. Die Regulation der Atemfrequenz erfolgte durch eine kontinuierliche Anpassung der Isoflurankonzentration im inspiratorischen Isofluran-Sauerstoffgemisch an die Atemtätigkeit der Tiere, die durch das Atemkissen gemessen wurde. Die Körpertemperatur der Tiere wurde durch die Temperatur des Warmluftstroms reguliert. Des Weiteren wurde die Injektion des Polarisats immer von der gleichen Person durchgeführt.

Bei Pyruvat handelt es sich um einen natürlicherweise im Körper vorkommenden Metaboliten. Die zu applizierende Menge bei der MRS oder MRSI, um ein ausreichend hohes Signal zu erhalten, bewegt sich allerdings im hyperphysiologischen Bereich. Bisher sind aber keine toxischen Auswirkungen aufgrund von Pyruvatapplikationen bekannt (Nelson *et al.*, 2013; Brindle, 2015).

Ein Vorteil der verwendeten Methode der Hyperpolarisationsspektroskopie ist, dass zeitlich aufgelöste Kurven für den Verlauf des gemessenen Pyruvat- und Laktatsignals gewonnen werden können. Diese Kurven geben das Signal aus den vorher aufgrund der T2-Bildgebung festgelegten Schichten zur Signalerfassung sehr selektiv wieder und somit auch das Tumorsignal, da die Schichten so gewählt wurden, dass sie möglichst alleinig den Tumor erfassten. Je nach genauer Position des Tumors mussten aber kleinere Anteile an anderen Strukturen (z.B. Muskulatur) in der gemessenen Schicht in Kauf genommen werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht somit darin, dass man keine orts aufgelösten Signale innerhalb des gemessenen Bereiches im Tier erhält und das erhaltene Signal so eine Summe aus allen im messsensitiven Bereich liegenden Strukturen darstellt. Dies erlaubt keine Beurteilung einer gegebenenfalls vorliegenden intratumoralen Heterogenität. Nachdem bei humanen Patienten der Tumor nicht nur aus einer Zelllinie entsteht, wodurch eine erhöhte intratumorale Heterogenität zu erwarten ist, wäre hier eine zusätzliche bildliche Erfassung des gesamten Tumors (und nicht nur eines einzelnen Voxels, was das Äquivalent zur schichtselektiven Erfassung im Rattenmodell darstellt), mittels MRSI in ausreichender Auflösung, sinnvoll.

2.5. Modellierung der ^{13}C -MRS-Daten

Die Modellierung der Pyruvatkurve stellt eine sehr robuste Methode dar, weil sie nur zwei gut eingrenzbare Modellierungsparameter beinhaltet und somit resistent gegen Konvergenzprobleme wie lokale Minima ist. Zudem ist keine Kenntnis von Randbedingungen notwendig, die die Modellierung sensibel beeinflussen oder verfälschen können. Bei dieser rechenleistungsarmen und generalisierten Modellierung der Laktatkurve mittels Moore-Penrose-pseudoinverser Matrix wird die Linearität der Laktatdifferenzialgleichung ausgenutzt und deshalb entstehen keine Divergenzprobleme sowie Probleme durch eine zu große Zahl an Freiheitsgraden. Die gemessenen Laktat- und Pyruvatkurven werden seriell modelliert und die Parameter $T_{lp,l}$ und k_{pl} schrittweise extrahiert. Das modellierte T_{lpyr} weist eine sehr hohe Sensitivität gegenüber dem auf Basis des T_1 -Sollwertes für Pyruvat ermittelten Skalierungsfaktors auf. Dieser Skalierungsfaktor wiederum ermöglicht die Berücksichtigung des in den Tumor eingespülten Laktats und erlaubt so in einem simplen, zweistufigen Verfahren die unabhängige Modellierung der Laktatkurve des nur im Tumor gebildeten Laktats nach Skalierung der Gesamtlaktatkurve. Allerdings wird bei der Verwendung eines Skalierungsfaktors angenommen, dass im Tumor produziertes Laktat und einströmendes Laktat den gleichen zeitlichen Verlauf aufweisen und somit bei dem einströmenden Laktat die Zeit des Transports vom Ursprungsorgan in den Tumor sowie potentielle andere Einflussfaktoren nicht berücksichtigt werden. Des Weiteren wird die potentiell *in vivo* stattfindende Rückkonversion von Laktat zu Pyruvat vernachlässigt, ebenso wie die Bildung von Alanin und Bikarbonat und auch der Austausch mit Pyruvathydrat. Dies entspräche einerseits zwar einer vollständigeren Beschreibung der physiologischen Vorgänge, würde andererseits aber die Anzahl der Modellierungsparameter vergrößern und auch eine getrennte Modellierung der beiden Ratengleichungen nicht mehr ermöglichen und so die Modellierung deutlich komplexer und fehleranfälliger gestalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich um ein robustes Modell handelt, das eindeutig zeigt, dass bei der Auswertung der gemessenen Daten zur Beurteilung der Laktatbildung im Tumor der zum Gesamtlaktatsignal beitragende, in den Tumor eingespülte Anteil des Laktats berücksichtigt werden muss und somit stark vereinfachte Modelle wie AUC-Ratios nur eine begrenzte Aussagekraft haben.

2.6. Histologie

Zur Beurteilung der Histopathologie der Tumore wurde die als Standardmethode geltende HE-Färbung eingesetzt. Die immunhistochemische Färbung mit CD31-Antikörpern zeigt die Gefäßdichte im Tumor (Bösmüller *et al.*, 2018). In der semi-quantitativen Beurteilung der Schnitte konnten keine deutlichen Unterschiede in der Vaskularisierung der beiden Tumorgruppen festgestellt werden. Allerdings lässt sich durch diese Analyse nicht ausschließen, dass die Tumore während der Spektroskopiemessung anästhesiebedingt unterschiedlich stark perfundiert waren. Um diesen Einfluss auf die Messung möglichst gering zu halten, wurde die Anästhesiedauer sowie Atmung und Temperatur der Tiere möglichst konstant gehalten (siehe Kapitel V. 2. 4.).

2.7. qRT-PCR

Die qRT-PCR wird als Standardmethode in der quantitativen Genetikforschung eingesetzt. Die Auswertung durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode beruht unter anderem auf der Normalisierung der Expression des untersuchten Gens zu einem Referenzgen. Dieses Referenzgen soll in allen Zellen immer auf dem gleichen Niveau exprimiert werden, was zum Beispiel sogenannten „Housekeeping“-Genen zugeschrieben wird. Allerdings wird in der Literatur diskutiert, dass klassische, als Referenzgene benutzte Gene doch einer Regulation mit schwankender Expression unterliegen. Dies gilt auch für das in vorliegender Studie verwendete Referenzgen GAPDH, dessen Verwendung als Referenzgen weit verbreitet ist (Waxman and Wurmbach, 2007; Liu *et al.*, 2013). Somit kann das gleiche Niveau der mRNA von LDH A der Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3 auch tatsächlich vorhandene Unterschiede verschleiern, falls das Referenzgen nicht, wie angenommen, in beiden Zelllinien gleich exprimiert wird.

2.8. Limitationen

In der Forschung ist der Einsatz von Modellen zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen, welche häufig bestimmte Rahmenbedingungen erfordern, sehr hilfreich und oft unumgänglich. Auch für die vorliegende Studie wurden die am besten zur Überprüfung der Hypothese geeigneten Modelle ausgewählt. Aus der Verwendung von Modellen ergeben sich aber zwangsläufig immer auch Limitationen, über die nachfolgend nochmals ein kurzer Überblick gegeben werden soll.

Durch die *in-vitro*-Kultivierung der isolierten Zellen findet eine Vorselektion nach *in*

vitro wachsenden Zellklonen statt, wodurch die tatsächliche Vielfalt an *in vivo* vorkommenden HCC-Zellsubtypen verfälscht widergegeben wird. Bei der darauffolgenden subkutanen Tumorimplantation entstehen die Tumore nicht durch die normalerweise bei der Erkrankung stattfindende Hepatokarzinogenese und wachsen zudem in einem Mikromilieu, welches das der Leber nicht adäquat widerspiegelt. Darüber hinaus erfolgt die Untersuchung der Tumore ausschließlich in dem Modellorganismus Ratte. Die daraus resultierenden Ergebnisse können nicht zwangsläufig 1:1 auf andere Organismen wie den Menschen übertragen werden. Auch die Modellierung der Bildgebungsdaten bildet durch Vereinfachungen nicht alle tatsächlich ablaufenden Prozesse in ihrer Gesamtheit ab.

3. Ausblick

Laktat spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und stellt deshalb sowohl in Bezug auf die Tumorentstehung als auch bei der Entwicklung neuer Therapien und der Beurteilung des Therapieansprechens ein aussichtsreiches Forschungsobjekt dar (San-Millán and Brooks, 2017). Die Hyperpolarisationsbildgebung mit $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat erscheint als vielversprechende, neue Methode zur Evaluierung der Laktatbildung in Tumoren, wobei das Abschneiden in laufenden klinischen Studien weiteren Aufschluss über die Anwendbarkeit dieser Technik in der Klinik geben wird.

Aufbauend auf den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie könnte in einem nächsten Schritt in diesem Modell die Wirksamkeit neuer Medikamente, welche Einfluss auf den Laktatstoffwechsel nehmen, untersucht und eruiert werden, ob deren Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzellen ebenfalls mit der Hyperpolarisations-MRS erfasst werden kann. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 14 den Warburg-Effekt beeinflusst und deren Blockade ein interessanter Therapieweg wäre (Iansante *et al.*, 2015).

Weil die k_{pl} -Werte, wie in Kapitel V. 1. diskutiert, nicht nur von der LDH-Aktivität, sondern auch von dem Pyruvattransport zum Tumor und in die Tumorzelle, der NADH-Verfügbarkeit, der Größe des endogenen Laktatpools und der Umsetzung von Pyruvat in andere Metaboliten beeinflusst werden, ist es aufgrund der breiten Vernetzung von Signalwegen und Metabolismus bei einer Beurteilung des Therapieansprechens, basierend auf der Änderung der Laktatproduktionsrate, wichtig, den Einfluss des

Therapeutikums auf die anderen Parameter mit zu berücksichtigen, um richtige Schlüsse aus den Messungen ziehen zu können. Zudem ist zu bedenken, dass das gleiche Therapeutikum bei unterschiedlichen Krebsarten unterschiedliche Änderungen hervorrufen kann (Lodi, Woods and Ronen, 2013).

Auch die Kombination der Hyperpolarisationsbildgebung mit anderen Bildgebungsmethoden wie der PET stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar. Bei der gleichzeitigen Applikation von hyperpolarisiertem ^{13}C -Pyruvat und ^{18}F FDG könnte so zum Beispiel im Tumor der Substanzenfluss über den gesamten glykolytischen Stoffwechselweg von der Glukoseaufnahme bis hin zur Laktatproduktion untersucht werden. So würde beispielsweise die vermehrte Umsetzung von Pyruvat in andere Metaboliten als Laktat ein vermindertes ^{13}C -Laktatsignal verursachen, aber nicht zwingend Einfluss auf die FDG-Aufnahme des Tumors haben und so noch umfangreichere Informationen über den Tumormetabolismus liefern als eine Technik alleine (Serrao and Brindle, 2016). Diese Kombination der beiden Methoden wäre an bereits existierenden klinischen PET-MR-Systemen möglich.

Alle durch diese Forschung erworbenen Kenntnisse können nicht nur in der Humanmedizin, sondern ebenso in der Tiermedizin Anwendung finden. Denn auch in der Tiermedizin spielt die Onkologie eine immer bedeutendere Rolle. Gerade in den Industrienationen hat sich die Lebensspanne der Haustiere durch eine bessere medizinische Versorgung erhöht, wodurch zum veterinärmedizinischen Alltag vermehrt ältere Patienten mit Krebsleiden gehören (Kidd, 2008). Auch diese tierischen Patienten werden von neuen Methoden zur Früherkennung von Tumoren und der schnellen Beurteilung des Therapieansprechens profitieren können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt beim Menschen eine der führenden tumorbedingten Todesursachen weltweit dar. In Deutschland gehört es sogar zu den wenigen Tumorerkrankungen mit steigender Inzidenz und Mortalität, weshalb es einer intensiven Forschung in diesem Bereich bedarf. Für das hepatozelluläre Karzinom ist eine frühe Tumordetektion und schnelle Beurteilung des Therapieansprechens von großer Bedeutung, da sich die Therapieaussichten mit früherer Tumordetektion verbessern. Gerade im frühen Stadium der Krankheit zeigen die Tumore aber häufig noch nicht die auf der spezifischen Gefäßversorgung beruhenden pathognomonischen Kriterien zur Diagnostik mittels Bildgebung. Deshalb erfordert eine nichtinvasive Diagnostik neue Detektionsmethoden wie die Hyperpolarisationsbildgebung.

In der onkologischen Forschung stellt Laktat ein kleines Molekül von großem Interesse dar. Seit der Entdeckung Otto Warburgs, dass Tumorzellen auch bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff vermehrt Laktat produzieren, zeigen sich immer mehr Vorteile, die sich für Tumorzellen aus der erhöhten Laktatproduktion ergeben. Hierzu zählen beispielsweise die Immunevasion, die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen und die Angiogeneese. Das macht den Laktatstoffwechsel zu einem aussichtsreichen Ziel in der Entwicklung neuer Tumorthapien. Laktat soll sich aber auch in der Kanzerogenese und im Therapieansprechen als zu untersuchender Prädiktor eignen, da bei Risikopatienten eine erhöhte Laktatproduktion im Gewebe zur Tumorfrüherkennung herangezogen werden und bei bekannten Tumoren eine Änderung in der Laktatproduktion nach Therapiebeginn Hinweise auf das Therapieansprechen geben kann. Die Hyperpolarisationsbildgebung stellt eine vielversprechende, neue, nichtinvasive Methode zur Beurteilung der Tumorbiologie dar. Mithilfe des hyperpolarisierten $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvats als injiziertem Substrat kann die Laktatproduktion in Tumoren mit dieser Methode *in vivo* und in Echtzeit untersucht werden.

In dieser Studie wurde am Beispiel des hepatozellulären Karzinoms der Laktatmetabolismus von verschiedenen, aus der Wistar-Ratte stammenden HCC-Zellklonen untersucht und die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) mit hyperpolarisiertem $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat als aussichtsreiche, neue Untersuchungsmethode zur Detektion des Laktatstoffwechsels in subkutan implantierten Tumoren getestet.

Im ersten Teil des Versuchs konnte gezeigt werden, dass es bei den isolierten HCC-Zellen verschiedene Subtypen gibt, die sich unter anderem in ihrem Laktatmetabolismus, abgeleitet von der LDH-Aktivität in den Zellen, unterscheiden. Zur weiteren Verwendung wurden die Zelllinien HCC-EB-2 (niedrige LDH-Aktivität) und HCC-EB-3 (hohe LDH-Aktivität) ausgewählt.

Im zweiten Teil des Versuchs wurden aus den zwei ausgewählten, in Teil eins isolierten HCC-Zellklonen HCC-EB-2 und HCC-EB-3 subkutane Tumore in der Nacktratte generiert. Hier konnte, übereinstimmend mit anderen Studien, ein aggressiveres bzw. schnelleres Wachstum der stärker Laktat-produzierenden Zelllinie HCC-EB-3 beobachtet werden. Die bereits *in vitro* festgestellten Unterschiede in der LDH-Aktivität blieben auch *in vivo* erhalten. Die Tumore, generiert aus den beiden Zelllinien HCC-EB-2 bzw. HCC-EB-3, konnten aufgrund ihrer verschiedenen, *ex vivo* bestimmten LDH-Aktivitäten ebenfalls signifikant differenziert werden. Diese Differenzierung wurde als Validierung für die Ergebnisse der Hyperpolarisations-MRS benutzt. Auch hier konnten die beiden Tumorgruppen signifikant nach ihren Laktatbildungsraten unterschieden werden. Für die Modellierung der MRS-Daten kam eine im Haus entwickelte Analysemethode zum Einsatz, mit welcher gezeigt werden konnte, dass das gemessene Laktatsignal aus vom Tumor selbst produziertem sowie eingespültem Laktat erzeugt wurde und zur Evaluierung der Laktatbildungsrate im Tumor das Signal des eingespülten Laktats aus dem Ursprungssignal herausgefiltert werden musste.

Zusammenfassend konnte mit dieser Studie also gezeigt werden, dass sich in ihrem Laktatmetabolismus unterscheidende HCC-Zellklone existieren und diese Unterschiede mit der Tumorphiliferation korrelieren. Demnach stellt der Laktatmetabolismus einen potentiellen neuen klinischen Marker zur Verbesserung der HCC-Diagnostik dar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Hyperpolarisations-MRS um eine ausreichend verlässliche und sensitive Bildgebungsmethode zur nicht-invasiven Unterscheidung der Subtypen *in vivo* handelt.

VII. SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer-related death globally in humans. In Germany, it even belongs to the few tumor diseases with increasing incidence and mortality, which is why comprehensive research on this topic is an urgent need. Early detection of the tumor and a fast determination of treatment response are very important in HCC, because chances of recovery rise with early diagnosis and therapy. The challenge is that, especially in early stage tumors, the criteria for imaging diagnostics based on specific vascularization are not yet apparent. Therefore, noninvasive diagnostics require new detection methods like hyperpolarization imaging.

In oncology research, lactate represents a small molecule of big interest. Since the original finding by Otto Warburg, that tumor cells also produce increased amounts of lactate with sufficient oxygen supply, more and more advantages for the tumor cells arising from the lactate production have been elucidated. These include, for example, immune evasion, migration, and angiogenesis. These factors make lactate metabolism a promising target for the development of new tumor therapies. Furthermore, lactate should also be a suitable predictor in carcinogenesis and therapy response, as enhanced lactate production in the tissue of at-risk patients could be used as an early biomarker, and within advanced tumors, a change in lactate production after therapy start can give an indication of therapy response. Hyperpolarization imaging is a promising, new, noninvasive method to evaluate tumor biology. By means of hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Pyruvate as an injected substrate, lactate production in the tumor can be monitored live by noninvasive magnetic resonance imaging methods.

In this study, lactate metabolism in different HCC cell clones isolated from rats was investigated, and magnetic resonance spectroscopy (MRS) with hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Pyruvate was investigated as a new, promising method for the detection of lactate metabolism in subcutaneous implanted tumors.

In the first part of the project, it could be shown that different HCC subtypes exist within the isolated HCC cells, which vary, among other things, in their lactate production, as derived from the LDH activity of the cells. In subsequent experiments, the cell lines HCC-EB-2 and HCC-EB-3 were selected, whereby HCC-EB-2 was considered to be a

cell line with low lactate production because of its low *in vitro* LDH activity, and HCC-EB-3 was considered to be a high lactate producer.

In the second part of the project, subcutaneous tumors were generated in nude rats by implantation of the selected cell clones, HCC-EB-2 and HCC-EB-3. Consistent with earlier findings, a more aggressive or faster growth of the cell line HCC-EB-3 correlating with the greater lactate production could be observed here. The previously observed *in vitro* difference in LDH activity remained unchanged *in vivo*. The tumors generated from the two cell lines, HCC-EB-2 or HCC-EB-3, could also be differentiated significantly by their diverse LDH activities, as determined *ex vivo*. This differentiation was used as validation for the results of the hyperpolarization MRS. Here, both tumor groups could also be differentiated significantly by their lactate production rate. For the modeling of the MRS data, an in-house developed analysis method was used, by which it could be shown that the measured lactate signal was caused by lactate produced by the tumor itself, as well as lactate inflow in the tumor, and that the lactate inflow needed to be subtracted from the original signal, in order to accurately evaluate the lactate production rate in the tumor.

In summary, this work demonstrated a heterogeneity in lactate metabolism amongst individual HCC cell clones, which correlates with tumor proliferation. Lactate metabolism, therefore, represents a novel marker for potential clinical development to provide improved HCC diagnostics. Furthermore, hyperpolarization MRS was shown to be a reliable and sensitive method to distinguish the subtypes *in vivo* by noninvasive imaging.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, R. W. *et al.* (2009) 'Reversible Interactions with para-Hydrogen Enhance NMR Sensitivity by Polarization Transfer', *Science*, 323(5922), pp. 1708–1711. doi: 10.1126/science.1168877.
- Ally, A. *et al.* (2017) 'Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma', *Cell*, 169(7), p. 1327–1341.e23. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.046.
- Andresen, C. *et al.* (2001) 'NIH : rnu ; are they all created equal ? A comparison of Taconic and Charles River rat strains P 132', pp. 6340–6340.
- Appelt, S. *et al.* (1998) 'Theory of spin-exchange optical pumping of ^3He and ^{129}Xe ', *Physical Review A*. American Physical Society, 58(2), pp. 1412–1439. doi: 10.1103/PhysRevA.58.1412.
- Ardenkjaer-Larsen, J. H. *et al.* (2003) 'Increase in signal-to-noise ratio of $> 10,000$ times in liquid-state NMR', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(18), pp. 10158–63. doi: 10.1073/pnas.1733835100.
- Arora, A. and Kumar, A. (2014) 'Treatment Response Evaluation and Follow-up in Hepatocellular Carcinoma.', *Journal of clinical and experimental hepatology*. Elsevier, 4(Suppl 3), pp. S126-9. doi: 10.1016/j.jceh.2014.05.005.
- Aubé, C. *et al.* (2017) 'EASL and AASLD recommendations for the diagnosis of HCC to the test of daily practice', *Liver International*. Wiley/Blackwell (10.1111), 37(10), pp. 1515–1525. doi: 10.1111/liv.13429.
- Ayuso, C. *et al.* (2018) 'Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines', *European Journal of Radiology*. Elsevier, 101, pp. 72–81. doi: 10.1016/J.EJRAD.2018.01.025.
- Beckert, S. *et al.* (2006) 'Lactate stimulates endothelial cell migration', *Wound Repair and Regeneration*. Wiley/Blackwell (10.1111), 14(3), pp. 321–324. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00127.x.
- Bolondi, L. *et al.* (2005) 'Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: The problem of hypovascular hepatocellular carcinoma', *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 42(1), pp. 27–34. doi: 10.1002/hep.20728.
- Bösmüller, H. *et al.* (2018) 'Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: Differential expression of CD31 and VEGFR-2 in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma', *Pathology - Research and Practice*. Urban & Fischer, 214(8), pp. 1136–1141. doi: 10.1016/J.PRP.2018.06.011.
- Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society. doi: 10.3322/caac.21492.
- Brindle, K. (2008) 'New approaches for imaging tumour responses to treatment', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 8(2), pp. 94–107. doi: 10.1038/nrc2289.

- Brindle, K. M. (2015) 'Imaging Metabolism with Hyperpolarized ¹³ C-Labeled Cell Substrates', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 137(20), pp. 6418–6427. doi: 10.1021/jacs.5b03300.
- Brizel, D. M. *et al.* (2001) 'Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 51(2), pp. 349–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567808> (Accessed: 16 December 2018).
- Buijs, M. *et al.* (2012) 'Spontaneous tumor regression in a syngeneic rat model of liver cancer: implications for survival studies.', *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*. NIH Public Access, 23(12), pp. 1685–91. doi: 10.1016/j.jvir.2012.08.025.
- But, D.-Y.-K., Lai, C.-L. and Yuen, M.-F. (2008) 'Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma.', *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 14(11), pp. 1652–6. doi: 10.3748/WJG.14.1652.
- Chen, B.-B. and Shih, T. T.-F. (2014) 'DCE-MRI in hepatocellular carcinoma-clinical and therapeutic image biomarker.', *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 20(12), pp. 3125–34. doi: 10.3748/wjg.v20.i12.3125.
- Chen, C.-J. *et al.* (2006) 'Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level', *JAMA*. American Medical Association, 295(1), pp. 65–73. doi: 10.1001/jama.295.1.65.
- Cho, E.-S. and Choi, J.-Y. (2015) 'MRI features of hepatocellular carcinoma related to biologic behavior.', *Korean journal of radiology*. Korean Society of Radiology, 16(3), pp. 449–64. doi: 10.3348/kjr.2015.16.3.449.
- Choi, J.-Y., Lee, J.-M. and Sirlin, C. B. (2014) 'CT and MR Imaging Diagnosis and Staging of Hepatocellular Carcinoma: Part II. Extracellular Agents, Hepatobiliary Agents, and Ancillary Imaging Features', *Radiology*. Radiological Society of North America, 273(1), pp. 30–50. doi: 10.1148/radiol.14132362.
- Choo, Q. *et al.* (1989) 'Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome', *Science*, 244(4902), pp. 359–362. doi: 10.1126/science.2523562.
- Christofk, H. R. *et al.* (2008) 'The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth', *Nature*. Nature Publishing Group, 452(7184), pp. 230–233. doi: 10.1038/nature06734.
- Commisso, C. *et al.* (2013) 'Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 497(7451), pp. 633–637. doi: 10.1038/nature12138.
- Cong, W.-M. *et al.* (2016) 'Practice guidelines for the pathological diagnosis of primary liver cancer: 2015 update.', *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 22(42), pp. 9279–9287. doi: 10.3748/wjg.v22.i42.9279.
- Daemen, A. *et al.* (2015) 'Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), pp.

- E4410–E4417. doi: 10.1073/pnas.1501605112.
- Day, S. E. *et al.* (2007) ‘Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging and spectroscopy’, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 1382–1387. doi: 10.1038/nm1650.
- Dhanasekaran, R., Limaye, A. and Cabrera, R. (2012) ‘Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics.’, *Hepatic medicine : evidence and research*. Dove Press, 4, pp. 19–37. doi: 10.2147/HMER.S16316.
- Dragan, Y. P. *et al.* (1993) ‘The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis.’, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 202(1), pp. 16–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8093813> (Accessed: 3 March 2019).
- Düwel, S. *et al.* (2016) ‘Multiparametric human hepatocellular carcinoma characterization and therapy response evaluation by hyperpolarized ^{13}C MRSI’, *NMR in Biomedicine*, 29(7), pp. 952–960. doi: 10.1002/nbm.3561.
- Eisenschmid, T. C. *et al.* (1987) ‘Para hydrogen induced polarization in hydrogenation reactions’, *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 109(26), pp. 8089–8091. doi: 10.1021/ja00260a026.
- Fan, J. *et al.* (2014) ‘Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production’, *Nature*. Nature Publishing Group, 510(7504), pp. 298–302. doi: 10.1038/nature13236.
- Faubert, B. *et al.* (2017) ‘Lactate Metabolism in Human Lung Tumors’, *Cell*. Elsevier Inc., 171(2), p. 358–371.e9. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.019.
- Fischer, K. *et al.* (2007) ‘Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells’, *Blood*, 109, pp. 3812–3819. doi: 10.1182/blood-2006-07.
- Galassi, M. *et al.* (2013) ‘Patterns of appearance and risk of misdiagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhosis at contrast enhanced ultrasound’, *Liver International*. Wiley/Blackwell (10.1111), 33(5), pp. 771–779. doi: 10.1111/liv.12124.
- Gallagher, F. A. *et al.* (2008) ‘Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ^{13}C -labelled bicarbonate’, *Nature*. Nature Publishing Group, 453(7197), pp. 940–943. doi: 10.1038/nature07017.
- Gallagher, F. A. *et al.* (2009) ‘Production of hyperpolarized [1,4- $^{13}\text{C}_2$]malate from [1,4- $^{13}\text{C}_2$]fumarate is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 106(47), pp. 19801–19806. doi: 10.1073/PNAS.0911447106.
- Galle, P. R. *et al.* (2018) ‘EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma’, *Journal of Hepatology*, 69(1), pp. 182–236. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.
- Gao, P. *et al.* (2009) ‘c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism’, *Nature*. Nature Publishing Group, 458(7239), pp. 762–765. doi: 10.1038/nature07823.
- Goetze, K. *et al.* (2011) ‘Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte

- migration and cytokine release', *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications, 39(2), pp. 453–463. doi: 10.3892/ijo.2011.1055.
- Gottlob, K. *et al.* (2001) 'Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(11), pp. 1406–18. doi: 10.1101/gad.889901.
- Groß, C. *et al.* (2015) 'Model matters: Differences in orthotopic rat hepatocellular carcinoma physiology determine therapy response to sorafenib', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2018.
- Guri, Y. *et al.* (2017) 'mTORC2 Promotes Tumorigenesis via Lipid Synthesis.', *Cancer cell*. Elsevier, 32(6), p. 807–823.e12. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.011.
- Harris, T. *et al.* (2009) 'Kinetics of hyperpolarized ¹³C1-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(43), pp. 18131–6. doi: 10.1073/pnas.0909049106.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) 'Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 324(5930), pp. 1029–33. doi: 10.1126/science.1160809.
- Heimbach, J. K. *et al.* (2018) 'AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma', *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 67(1), pp. 358–380. doi: 10.1002/hep.29086.
- Heindryckx, F., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. (2009) 'Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research.', *International journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell, 90(4), pp. 367–86. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A. and Mueller-Klieser, W. (2011) 'Lactate: a metabolic key player in cancer.', *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 71(22), pp. 6921–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
- Holle, A. W., Young, J. L. and Spatz, J. P. (2016) 'In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, 97, pp. 270–279. doi: 10.1016/J.ADDR.2015.10.007.
- Hu, S. *et al.* (2011) '¹³C-pyruvate imaging reveals alterations in glycolysis that precede c-Myc-induced tumor formation and regression.', *Cell metabolism*. Elsevier, 14(1), pp. 131–42. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.012.
- Hundshammer, C., Düwel, S., *et al.* (2018) 'Hyperpolarized Amino Acid Derivatives as Multivalent Magnetic Resonance pH Sensor Molecules', *Sensors*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 18(2), p. 600. doi: 10.3390/s18020600.
- Hundshammer, C., Braeuer, M., *et al.* (2018) 'Simultaneous characterization of tumor cellularity and the Warburg effect with PET, MRI and hyperpolarized¹³C-MRSI', *Theranostics*. doi: 10.7150/thno.25162.
- Hundshammer, C., Düwel, S. and Schilling, F. (2017) 'Imaging of Extracellular pH Using Hyperpolarized Molecules', *Israel Journal of Chemistry*. Wiley-

- Blackwell, 57(9), pp. 788–799. doi: 10.1002/ijch.201700017.
- Iansante, V. *et al.* (2015) ‘PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation’, *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms8882.
- IARC (1994) ‘IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Hepatitis Viruses’. Lyon, France, 59.
- Ioannou, G. N. *et al.* (2013) ‘The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection’, *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 57(1), pp. 249–257. doi: 10.1002/hep.25800.
- Ippolito, D. *et al.* (2018) ‘Recent advances in non-invasive magnetic resonance imaging assessment of hepatocellular carcinoma.’, *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 24(23), pp. 2413–2426. doi: 10.3748/wjg.v24.i23.2413.
- Jain, D. (2014) ‘Tissue diagnosis of hepatocellular carcinoma.’, *Journal of clinical and experimental hepatology*. Elsevier, 4(Suppl 3), pp. S67-73. doi: 10.1016/j.jceh.2014.03.047.
- Jiang, H.-Y. *et al.* (2018) ‘Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: From diagnosis to prognosis.’, *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 24(22), pp. 2348–2362. doi: 10.3748/wjg.v24.i22.2348.
- Jiang, T. *et al.* (2017) ‘Diffusion-weighted imaging (DWI) of hepatocellular carcinomas: a retrospective analysis of the correlation between qualitative and quantitative DWI and tumour grade.’, *Clinical radiology*. Elsevier, 72(6), pp. 465–472. doi: 10.1016/j.crad.2016.12.017.
- de Jong, W. H. *et al.* (1980) ‘The athymic nude rat’, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 17(2), pp. 163–172. doi: 10.1016/0090-1229(80)90084-7.
- Kenny, P. A. *et al.* (2007) ‘The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression’, *Molecular Oncology*. No longer published by Elsevier, 1(1), pp. 84–96. doi: 10.1016/J.MOLONC.2007.02.004.
- Kensler, T. W. *et al.* (2011) ‘Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology.’, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. Oxford University Press, 120 Suppl 1(Suppl 1), pp. S28-48. doi: 10.1093/toxsci/kfq283.
- Kidd, C. (2008) ‘The many challenges of veterinary oncology.’, *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*. Canadian Veterinary Medical Association, 49(11), pp. 1132–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183739> (Accessed: 6 January 2019).
- Kim, S. H. *et al.* (2011) ‘Prognostic Factors and 10-Year Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma After Curative Hepatectomy’, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(4), pp. 598–607. doi: 10.1007/s11605-011-1452-7.
- Kramer, M. G. *et al.* (2005) ‘Evaluation of hepatocellular carcinoma models for preclinical studies’, *Drug Discovery Today: Disease Models*. Elsevier, 2(1), pp. 41–49. doi: 10.1016/J.DDMOD.2005.05.009.

- Larson, P. E. Z. *et al.* (2018) 'Investigation of analysis methods for hyperpolarized ¹³C-pyruvate metabolic MRI in prostate cancer patients', *NMR in Biomedicine*. Wiley-Blackwell, 31(11), p. e3997. doi: 10.1002/nbm.3997.
- Lee, J.-S. and Thorgeirsson, S. S. (2006) 'Comparative and integrative functional genomics of HCC', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 25(27), pp. 3801–3809. doi: 10.1038/sj.onc.1209561.
- Lee, J. V. *et al.* (2014) 'Akt-Dependent Metabolic Reprogramming Regulates Tumor Cell Histone Acetylation', *Cell Metabolism*. Cell Press, 20(2), pp. 306–319. doi: 10.1016/J.CMET.2014.06.004.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2013) 'Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms', *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)*, (Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL). Available at: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Accessed: 28 June 2018).
- Liu, S. *et al.* (2013) 'Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in tumor tissues from male hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B infection and cirrhosis', *Cancer Biomarkers*. IOS Press, 13(5), pp. 345–349. doi: 10.3233/CBM-130365.
- Lodi, A., Woods, S. M. and Ronen, S. M. (2013) 'Treatment with the MEK inhibitor U0126 induces decreased hyperpolarized pyruvate to lactate conversion in breast, but not prostate, cancer cells.', *NMR in biomedicine*. NIH Public Access, 26(3), pp. 299–306. doi: 10.1002/nbm.2848.
- Lu, H., Forbes, R. A. and Verma, A. (2002) 'Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(26), pp. 23111–5. doi: 10.1074/jbc.M202487200.
- Lu, J., Tan, M. and Cai, Q. (2015) 'The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism.', *Cancer letters*. NIH Public Access, 356(2 Pt A), pp. 156–64. doi: 10.1016/j.canlet.2014.04.001.
- Malek, N. P. *et al.* (2014) 'Clinical practice guideline: The Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma', *Dtsch Arztebl Int*, 111(7), pp. 101–6. doi: 10.3238/arztebl.2014.0101.
- Mandai, M. *et al.* (2011) 'Assessment of hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced ultrasound with perfluorobutane microbubbles: comparison with dynamic CT.', *The British journal of radiology*. British Institute of Radiology, 84(1002), pp. 499–507. doi: 10.1259/bjr/38682601.
- Marengo, A., Rosso, C. and Bugianesi, E. (2016) 'Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis', *Annual Review of Medicine*, 67(1), pp. 103–117. doi: 10.1146/annurev-med-090514-013832.
- Maruo, K. *et al.* (1982) 'Human tumour xenografts in athymic rats and their age dependence.', *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 45(5), pp. 786–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7082561> (Accessed: 14 December 2018).

- Matsui, O. *et al.* (2011) 'Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis', *Abdominal Imaging*. Springer-Verlag, 36(3), pp. 264–272. doi: 10.1007/s00261-011-9685-1.
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L. and London, W. T. (2015) 'Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability.', *Clinics in liver disease*. NIH Public Access, 19(2), pp. 223–38. doi: 10.1016/j.cld.2015.01.001.
- McMahon, B. J. (2010) 'Natural History of Chronic Hepatitis B', *Clinics in Liver Disease*, 14(3), pp. 381–396. doi: 10.1016/j.cld.2010.05.007.
- Metallo, C. M. *et al.* (2012) 'Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia', *Nature*. Nature Publishing Group, 481(7381), pp. 380–384. doi: 10.1038/nature10602.
- Migita, T. *et al.* (2008) 'ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 68(20), pp. 8547–8554. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1235.
- Muenzner, J. K. *et al.* (2018) 'Generation and characterization of hepatocellular carcinoma cell lines with enhanced cancer stem cell potential', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 22(12), pp. 6238–6248. doi: 10.1111/jcmm.13911.
- Murakami, T. *et al.* (1992) 'Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes.', *The Journal of biological chemistry*, 267(13), pp. 9300–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1339457> (Accessed: 12 March 2019).
- Nelson, S. J. *et al.* (2013) 'Metabolic Imaging of Patients with Prostate Cancer Using Hyperpolarized [1-13C]Pyruvate', *Science translational medicine*. NIH Public Access, 5(198), p. 198ra108. doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3006070.
- Newell, P. *et al.* (2008) 'Experimental models of hepatocellular carcinoma', *Journal of Hepatology*. Elsevier, 48(5), pp. 858–879. doi: 10.1016/J.JHEP.2008.01.008.
- Oliveira, P. A. *et al.* (2007) 'Chemical carcinogenesis', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Academia Brasileira de Ciências, 79(4), pp. 593–616. doi: 10.1590/S0001-37652007000400004.
- Ono, A. *et al.* (2014) 'Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats', *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(5), pp. 785–794. doi: 10.2131/jts.39.785.
- op den Winkel, M. *et al.* (2012) 'Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. Validation and Ranking of Established Staging-Systems in a Large Western HCC-Cohort', *PLoS ONE*, 7(10), p. e45066. doi: 10.1371/journal.pone.0045066.
- Papandreou, I. *et al.* (2006) 'HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption', *Cell Metabolism*. Cell Press, 3(3), pp. 187–197. doi: 10.1016/J.CMET.2006.01.012.

- Parkin, D. M. (2006) 'The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002', *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 118(12), pp. 3030–3044. doi: 10.1002/ijc.21731.
- Pavlova, N. N. and Thompson, C. B. (2016) 'The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism', *Cell Metabolism*. Cell Press, 23(1), pp. 27–47. doi: 10.1016/J.CMET.2015.12.006.
- Prost, R. W. (2008) 'Magnetic resonance spectroscopy', *Medical Physics*. John Wiley & Sons, Ltd, 35(10), pp. 4530–4544. doi: 10.1118/1.2975225.
- Reineri, F., Boi, T. and Aime, S. (2015) 'ParaHydrogen Induced Polarization of ^{13}C carboxylate resonance in acetate and pyruvate', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 5858. doi: 10.1038/ncomms6858.
- Reynolds, M. R. *et al.* (2014) 'Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 33(5), pp. 556–566. doi: 10.1038/onc.2012.635.
- Rizwan, A. *et al.* (2013) 'Relationships between LDH-A, lactate, and metastases in 4T1 breast tumors.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 19(18), pp. 5158–69. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3300.
- Robert Koch-Institut (2016) *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. doi: 10.17886/rkipubl-2016-014.
- Robertson, R. T. *et al.* (2016) 'Development , differentiation , and vascular components of subcutaneous and intrahepatic Hepa129 tumors in a mouse model of hepatocellular carcinoma', *Histology and Histopathology*, 31(4), pp. 403–413. doi: 10.14670/hh-11-683.
- Roth V. (2006) *Doubling Time Computing*. Available at: <http://doubling-time.com/compute.php> (Accessed: 8 August 2018).
- San-Millán, I. and Brooks, G. A. (2017) 'Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect.', *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 38(2), pp. 119–133. doi: 10.1093/carcin/bgw127.
- Santos, N. P., Colaço, A. A. and Oliveira, P. A. (2017) 'Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review', *Tumor Biology*, 39(3). doi: 10.1177/1010428317695923.
- Seahorse XFe96 Analyzer | Agilent (no date). Available at: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-analyzers/seahorse-xfe96-analyzer> (Accessed: 19 March 2019).
- Search of: *^{13}C pyruvate hyperpolarized* - List Results - ClinicalTrials.gov (no date). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=13c+pyruvate+hyperpolarized&cntry=&state=&city=&dist=> (Accessed: 16 March 2019).
- Serrao, E. M. *et al.* (2016) 'MRI with hyperpolarised [^{13}C]pyruvate detects advanced pancreatic preneoplasia prior to invasive disease in a mouse model', *Gut*, 65(3), pp. 465–475. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310114.
- Serrao, E. M. *et al.* (2018) 'Analysis of ^{13}C and ^{14}C labeling in pyruvate and lactate

- in tumor and blood of lymphoma-bearing mice injected with 13 C- and 14 C-labeled pyruvate', *NMR in Biomedicine*, p. e3901. doi: 10.1002/nbm.3901.
- Serrao, E. M. and Brindle, K. M. (2016) 'Potential Clinical Roles for Metabolic Imaging with Hyperpolarized [1-(13)C]Pyruvate.', *Frontiers in oncology*. Frontiers Media SA, 6, p. 59. doi: 10.3389/fonc.2016.00059.
- Sersté, T. *et al.* (2012) 'Accuracy and disagreement of computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules: Role of biopsy', *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 55(3), pp. 800–806. doi: 10.1002/hep.24746.
- Sheng, S. L. *et al.* (2012) 'Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma', *FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 279(20), pp. 3898–3910. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08748.x.
- Shim, H. *et al.* (1997) 'c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 94(13), pp. 6658–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192621> (Accessed: 27 January 2019).
- Siddiqui, M. T. *et al.* (2002) 'Diagnostic utility of the HepPar1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples', *Cancer Cytopathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 96(1), pp. 49–52. doi: 10.1002/cncr.10311.
- Society, V. *et al.* (2009) 'Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten', pp. 1–4.
- Stern, R. *et al.* (2002) 'Lactate Stimulates Fibroblast Expression of Hyaluronan and CD44: The Warburg Effect Revisited', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 276(1), pp. 24–31. doi: 10.1006/EXCR.2002.5508.
- Suh, Y. J. *et al.* (2012) 'Preoperative prediction of the microvascular invasion of hepatocellular carcinoma with diffusion-weighted imaging', *Liver Transplantation*. John Wiley & Sons, Ltd, 18(10), pp. 1171–1178. doi: 10.1002/lt.23502.
- Teague, C. R. *et al.* (2007) 'Metabonomic Studies on the Physiological Effects of Acute and Chronic Psychological Stress in Sprague–Dawley Rats', *Journal of Proteome Research*, 6(6), pp. 2080–2093. doi: 10.1021/pr060412s.
- Theis, T. *et al.* (2015) 'Microtesla SABRE Enables 10% Nitrogen-15 Nuclear Spin Polarization', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 137(4), pp. 1404–1407. doi: 10.1021/ja512242d.
- Thompson, M. L., Kunkel, E. J. and Ehrhardt, R. O. (2014) 'Cryopreservation and Thawing of Mammalian Cells', *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470015902.a0002561.pub2.
- Valvona, C. J. *et al.* (2016) 'The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor', *Brain Pathology*, 26(1), pp. 3–17. doi: 10.1111/bpa.12299.

- Varna, M., Bertheau, P. and Legrès, L. (2014) 'Tumor Microenvironment in Human Tumor Xenografted Mouse Models', *Journal of Analytical Oncology*, 3(3), pp. 159–166. doi: 10.6000/1927-7229.2014.03.03.6.
- Verna, L., Whysner, J. and Williams, G. M. (1996) 'N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation', *Pharmacology & Therapeutics*. Pergamon, 71(1–2), pp. 57–81. doi: 10.1016/0163-7258(96)00062-9.
- Vilana, R. *et al.* (2010) 'Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound', *Hepatology*. Wiley-Blackwell, 51(6), pp. 2020–2029. doi: 10.1002/hep.23600.
- Vu, L. N., Morelli, J. N. and Szklaruk, J. (2017) 'Basic MRI for the liver oncologists and surgeons.', *Journal of hepatocellular carcinoma*. Dove Press, 5, pp. 37–50. doi: 10.2147/JHC.S154321.
- W.M.S. Russell and R.L. Burch (no date) *The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S. Russell and R.L. Burch*. Available at: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc (Accessed: 21 December 2018).
- Walenta, S. *et al.* (2000) 'High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers.', *Cancer research*, 60(4), pp. 916–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706105> (Accessed: 2 November 2018).
- Walenta, S. and Mueller-Klieser, W. F. (2004) 'Lactate: mirror and motor of tumor malignancy', *Seminars in Radiation Oncology*. W.B. Saunders, 14(3), pp. 267–274. doi: 10.1016/J.SEMRADONC.2004.04.004.
- Wang, C. *et al.* (2011) 'Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples', *Cancer Letters*. Elsevier, 313(2), pp. 154–166. doi: 10.1016/J.CANLET.2011.08.031.
- Warburg O, Posener K and Negelein E (1924) 'Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle', *Biochem Zeitschr.*, 152, pp. 309–344. doi: 10.1515/bchm2.1901.31.3-4.353.
- Waxman, S. and Wurmbach, E. (2007) 'De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma.', *BMC genomics*. BioMed Central, 8, p. 243. doi: 10.1186/1471-2164-8-243.
- Wespi, P. *et al.* (2018) 'Overestimation of cardiac lactate production caused by liver metabolism of hyperpolarized [1- ¹³ C]pyruvate', *Magnetic Resonance in Medicine*, 80(5), pp. 1882–1890. doi: 10.1002/mrm.27197.
- WHO (2018) *Liver cancer fact sheet*. Available at: <http://gco.iarc.fr/today> (Accessed: 1 October 2018).
- Wieman, H. L., Wofford, J. A. and Rathmell, J. C. (2007) 'Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Trafficking', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by B. Margolis, 18(4), pp. 1437–1446. doi: 10.1091/mbc.e06-07-0593.

- Wilson, D. M. *et al.* (2010) 'Multi-compound polarization by DNP allows simultaneous assessment of multiple enzymatic activities in vivo', *Journal of Magnetic Resonance*. Academic Press, 205(1), pp. 141–147. doi: 10.1016/J.JMR.2010.04.012.
- Witney, T. H. *et al.* (2009) 'A comparison between radiolabeled fluorodeoxyglucose uptake and hyperpolarized (13)C-labeled pyruvate utilization as methods for detecting tumor response to treatment.', *Neoplasia (New York, N.Y.)*. Neoplasia Press, 11(6), p. 574–82, 1 p following 582. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484146> (Accessed: 27 January 2019).
- Xu, X. *et al.* (2009) 'Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 124(6), pp. 1330–1337. doi: 10.1002/ijc.24078.
- Yang, W. *et al.* (2012) 'Estrogen represses hepatocellular carcinoma (HCC) growth via inhibiting alternative activation of tumor-associated macrophages (TAMs).', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(48), pp. 40140–9. doi: 10.1074/jbc.M112.348763.
- Yaromina, A. *et al.* (2009) 'Co-localisation of hypoxia and perfusion markers with parameters of glucose metabolism in human squamous cell carcinoma (hSCC) xenografts', *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 85(11), pp. 972–980. doi: 10.3109/09553000903232868.
- Ye, J. *et al.* (2012) 'Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(18), pp. 6904–9. doi: 10.1073/pnas.1204176109.
- Ying, H. *et al.* (2012) 'Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism', *Cell*. Cell Press, 149(3), pp. 656–670. doi: 10.1016/J.CELL.2012.01.058.
- Yuan, Z. *et al.* (2010) 'Role of magnetic resonance diffusion-weighted imaging in evaluating response after chemoembolization of hepatocellular carcinoma', *European Journal of Radiology*, 75(1), pp. e9–e14. doi: 10.1016/j.ejrad.2009.05.040.
- Zhu, A. X. *et al.* (2009) 'Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study.', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 27(18), pp. 3027–35. doi: 10.1200/JCO.2008.20.9908.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	2
Abb. 2: Humanes hepatozelluläres Karzinom (Pfeil) mit (a) arterieller Hypervaskularisation und (b) dem sogenannten Wash-out in der späteren, portalvenösen Phase	8
Abb. 3: Diagnosealgorithmus des Leitlinienprogramms Onkologie bei malignitätsverdächtigen Lebertumoren (Abgebildet mit freundlicher Genehmigung des Leitlinienprogramms Onkologie); <i>CE-MRT: contrast-enhanced MRT; CE-CT: contrast-enhanced CT; CE-US: contrast-enhanced Ultrasound; KM: Kontrastmittel</i>	11
Abb. 4: Humanes hepatozelluläres Karzinom (mit Pfeil markiert) (a) in der DWI und (b) die dazugehörige ADC-Karte.....	13
Abb. 5: Übersicht über die Tiermodelle des hepatozellulären Karzinoms: (a) spontane Modelle, (b) „Xenograft“-Modelle und (c) syngene Modelle nach Santos, Colaço und Oliveira (2017), übersetzt aus dem Englischen; „ <i>GEM</i> “: <i>genetic engineered mouse model</i>	22
Abb. 6: Reaktionsgleichung zwischen $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat und $[1-^{13}\text{C}]$ Laktat (beide Moleküle dargestellt in deprotonierter Form); <i>LDH: Laktatdehydrogenase, NAD^+: Nikotinamadenindinukleotid (oxidierte Form), NADH: Nikotinamadenindinukleotid (reduzierte Form); H^+: Proton</i>	28
Abb. 7: Beispiel eines Score Sheets zur Beurteilung der Tiere während des Versuchs (Blatt 1: Gewichtsentwicklung, Blatt 2: Allgemeinzustand).....	34
Abb. 8: (a) Kleintier-Magnetresonanztomograph in der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar mit einem 7T MR901 Magneten (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) und Bruker AVANCE III HD Elektronik (Bruker Corporation, Billerica, USA); (b) ^{13}C -Oberflächenspulen (^{13}C Miniflex 20mm, single-channel; RAPID Biomedical GmbH, Würzburg-Rimpf, Deutschland).....	41
Abb. 9: Darstellung der selektiven Schichten (hell- bzw. dunkelgrün) zur Erfassung der Tumorspektren bei der Hyperpolarisationsbildgebung, basierend auf den zuvor generierten anatomischen Bildern (links axiale und rechts coronale Schichtführung).....	42
Abb. 10: Benutzeroberfläche der Spektroskopiedatenrekonstruktions- und -prozessierungssoftware mit Beschriftung der wichtigsten Bedienfelder für diese Studie	43
Abb. 11: Beispiel für erhaltene Spektren nach Einspeisen der Rohdaten in die Prozessierungssoftware; links gemittelt über die gesamte Messzeit, rechts im zeitlichen Verlauf.....	44
Abb. 12: HyperSense DNP Polarizer (Oxford Instruments, Abingdon, UK)	46
Abb. 13: Mikrographie einer CD31-Färbung; Gefäßanschnitte mit * gekennzeichnet	54
Abb. 14: Lichtmikroskopische Morphologie der Zellklone (a) HCC-EB-2 und (b) HCC-EB-3 <i>in vitro</i>	58

- Abb. 15: LDH-Aktivität [U/l] der beiden Zellklone HCC-EB-2 und HCC-EB-3 in einer Million Zellen bei drei wiederholten Messungen; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,0003$ 59
- Abb. 16: Glykolytische Aktivität der Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3, ermittelt mit der „Seahorse“-Analyse anhand der extrazellulären Ansäuerungsrate (zur Verfügung gestellt von Dr. Marija Trajkovic-Arsic, Essen); *ECAR: extracellular acidification rate, RFU: relative fluorescence unit* 60
- Abb. 17: Gruppierung der Zeitspanne von der Tumorimplantation bis zur Messung nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,0005$ 61
- Abb. 18: Gruppierung der Tumorumfänge am Messtag nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung 62
- Abb. 19: Gruppierung der k_{pl} -Werte der Tumore nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3 (a) mit allen Datensätzen; rote Kennzeichnung der drei Datensätze mit Residuum $> 0,7$; *signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit $p = 0,002$; (b) ohne die drei ausgeschlossenen Datensätze; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit $p = 0,0006$ 63
- Abb. 20: Exemplarische Darstellung zweier Modellierungen: (a) eines Tumors mit einer großen Menge eingespültem Laktat, (b) eines Tumors mit kaum eingespültem Laktat 65
- Abb. 21: LDH-Aktivität [U/g] im Tumorgewebe von insgesamt 20 subkutanen Tumoren, generiert aus der Zelllinie HCC-EB-2 bzw. HCC-EB-3; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p < 0,0001$ 66
- Abb. 22: Korrelation der k_{pl} -Werte mit der LDH-Aktivität der Tumore ($r = 0,7332$; $p = 0,0008$; lin.Reg. $r^2 = 0,5376$; $n = 17$)..... 67
- Abb. 23: Relative Expression der mRNA von LDH A, gruppiert nach den Zelllinien HCC-EB-2 und HCC-EB-3; schwarze Datenpunkte: fünf exemplarisch ausgewählte Tumore dieser Studie; graue Datenpunkte: Tumore aus Vorversuchen in Wistar-Ratten..... 68
- Abb. 24: HE-Färbung der subkutanen Tumore, (1a) entstanden aus Linie HCC-EB-2 bzw. (1b) aus Linie HCC-EB-3; (2a) Teilausschnitt aus 1a in stärkerer Vergrößerung; (2b) Teilausschnitt aus 1b in stärkerer Vergrößerung 69

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Für Zellkultur und Zellversuche verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte, die in den einzelnen Kapiteln nicht explizit aufgeführt sind.....	37
Tabelle 2: Übersicht über die konsekutiv angefertigten Schnitte und deren Verwendung.....	50
Tabelle 3: Abfolge der einzelnen Schritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit Dauer und verwendeter Substanz	51
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Antikörper und Protokolle einschließlich Ursprung, Hersteller, Verdünnung und Vorbehandlung	51
Tabelle 5: Ablauf und verwendete Reagenzien des Protokolls „IHC Rabbit polymer“.....	52
Tabelle 6: Ablauf und verwendete Reagenzien des Protokolls „IHC F“	53
Tabelle 7: Verdopplungszeiten der isolierten Zellklone	57

XI. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ernst Rummeny und Herrn PD Dr. med. Rickmer Braren für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Rahmen einer Anstellung am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München planen und anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger und Frau PD Dr. med. vet. Christine Baumgartner danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU bzw. am Klinikum rechts der Isar seitens der Tiermedizin.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Georg Kaissis bedanken! Er hat mich nicht nur in das Thema eingearbeitet und mich bei der Planung und Durchführung angeleitet, sondern ist für mich darüber hinaus zu einem sehr geschätzten, guten Freund geworden. Besonders bedanken möchte ich mich dafür, dass er mir sowohl fachlich als auch persönlich immer mit Rat und Tat zur Seite stand, geduldig alle meine Fragen beantwortet hat und mir stets geholfen hat, die auftauchenden Probleme zu lösen. Ohne die Unterstützung dieses außerordentlich begabten Wissenschaftlers wäre ich nie so weit gekommen.

Mein umfassender Dank gilt auch Frau PD Dr. rer. nat. Jennifer Altomonte, die mir alles beigebracht hat, was ich über Zellkultur wissen muss und so den Grundstein dafür gelegt hat, dass ich alle meine *in-vitro*-Experimente und Tumorimplantationen wissenschaftlich fundiert und eigenständig durchführen konnte. Mit ihrer hilfsbereiten Art war sie für mich jederzeit eine fachkundige Ansprechpartnerin.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Franz Schilling, Herrn Geoffrey Topping, Ph.D. und Herrn Martin Grashei bedanke ich mich sehr für die exzellente Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche, vor allem für die Unterstützung bei den ^{13}C -Spektroskopiemessungen, für deren Durchführung mehr als zwei Hände gleichzeitig von Nöten waren, für die Hilfe bei der Datenprozessierung, welche ihr physikalisches Fachwissen erforderte sowie für alle geduldigen Erklärungen.

Frau Dr. med. vet. Katja Steiger und ihren Mitarbeiterinnen Frau Olga Seelbach und Frau Marion Mielke möchte ich ganz herzlich für die fachliche Beratung sowie die Einweisung in die histologische Aufarbeitung und Beurteilung der Proben danken.

Meinen lieben Kolleginnen Dr. med. vet. Miriam Braeuer, Melanie Jäkel und Teresa Krabbe danke ich sehr für die vielen Gespräche und guten Ratschläge bei fachlichen und persönlichen Anliegen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Roman Nawroth und seiner Mitarbeiterin Judith Schäfers danke ich für die Bereitstellung des Homogenisators zur Probenaufarbeitung und die Unterstützung bei der qRT-PCR-Analyse.

Frau Dr. Marija Trajkovic-Arsic danke ich für die Durchführung der Seahorse-Analyse in der Abteilung für Translationale Onkologie Solider Tumore des Universitätsklinikums Essen.

Ich danke auch den Mitarbeiterinnen der klinischen Chemie für die gute Zusammenarbeit ebenso wie Frau Daniela Steinmetz, der ich zusätzlich für die gewissenhafte und liebevolle Pflege der Tiere danken möchte.

Mein unendlicher Dank gilt auch Juliane Hunger, Julia Sareiter, Carolin Bernhold und Bettina Bentgens-Hardieck, die ich schon seit so vielen Jahren als treue und verlässliche Freunde an meiner Seite weiß. Sie haben mich während des Studiums und auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit immer begleitet, motiviert und bestärkt.

Zuletzt möchte ich mich noch inständig bei meiner gesamten Familie bedanken - und zwar nicht nur für die Suche nach Rechtschreibfehlern. Ich danke meinen Geschwistern Stephanie und Bernhard Bliemsrieder, mit denen mich so viel verbindet und die mich immer wieder dazu inspirieren, Dinge auch aus anderen Blickwinkeln zu betrachten.

Meinen Eltern Gabriele und Günther Bliemsrieder danke ich aus tiefstem Herzen für den Rückhalt, den sie mir immer gegeben haben und das wunderbare Elternhaus, in dem ich mit meinen Geschwistern aufwachsen durfte! Sie haben immer an mich geglaubt, mich uneingeschränkt unterstützt und mir ermöglicht, dahin zu kommen, wo ich jetzt bin.